
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

***E. histolytica*: ESTUDIO *in vitro* DE LOS MECANISMOS
MOLECULARES DE SU VIRULENCIA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA:

M. en C. MARÍA DEL ROSARIO LÓPEZ VANCELL

DIRECTOR DE TESIS: DR. RUY PÉREZ TAMAYO
COMITÉ TUTORAL: DRA. IRMGARD MONTFORT HAPPEL
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA

MÉXICO D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Medicina Experimental, de la Facultad de Medicina de la UNAM, siendo dirigida por los doctores Ruy Pérez Tamayo (Tutor), Irmgard Montfort Happel y Roberto Arreguín Espinosa (Asesores). Para la realización del Doctorado conté con una beca otorgada por El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), registro 25481.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: DR. ALEJANDRO ALAGÓN CANO

SECRETARIO: DR. RUY PÉREZ TAMAYO

VOCAL: DRA. MA. IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR

VOCAL: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ

VOCAL: DR. VÍCTOR TSUTSUMI FUJEYOSHI

SUPLENTE: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ

SUPLENTE: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ

A María y Erik

A mis padres Emma y Rafael

A mis hermanas Emma y Dolores

Agradezco al Dr. Ruy Pérez Tamayo el haberme dado la oportunidad de trabajar bajo su dirección en su laboratorio.

Quiero agradecer a la Dra. Irmgard Montfort su interés en la realización de este trabajo, así como sus enseñanzas, muy importantes en mi formación científica.

Asimismo, deseo agradecer al Dr. Roberto Arreguín Espinosa su paciente e invaluable ayuda en este trabajo, y por haberme acogido como alumna. Gracias por su amistad y apoyo.

Gracias:

A cada uno de los miembros del jurado, por su tiempo invertido en la revisión de este trabajo, sus comentarios lo enriquecieron.

A la Dra. Ruth Jaimez por su gran ayuda en el análisis estadístico de los resultados, así como al Dr. Rubén Martínez por su valiosa ayuda en los esquemas de inmunización.

A los Ings Omar Agni García y Marco Gudiño Zayas por su invaluable ayuda en la elaboración de las imágenes de esta tesis.

A la Dra. Lourdes Velasco por todo su apoyo.

A Malena, Paty, Verónica y Gloria por estar cerca.

A mis compañeros de laboratorio: Carmen, Alfonso, Augusto, Mario y Espiri por todo lo que me enseñaron.

A Adriana, Angel, Pedro y Eusebio por su apoyo técnico.

“There is no greater impediment to progress in the science than the desire to see it take place too quickly”

Albert Einstein

PRÓLOGO

Entamoeba histolytica es el parásito responsable de la amibiasis en el humano. La patogenicidad de la amiba parece variar en función de las condiciones ambientales, del estado general de salud del hospedero y otros factores más, de manera que su acción puede producir desde infecciones intestinales asintomáticas, hasta disentería grave e incluso amibiasis invasora. Aún no ha sido posible atribuir a algún factor del hospedero un papel decisivo en el establecimiento de la lesión hepática o intestinal. Por esta razón, en las últimas décadas la investigación se ha enfocado al estudio de los factores de virulencia del parásito, así como a los mecanismos moleculares que, por lo menos en principio, pudiesen explicar las lesiones que produce. Las principales moléculas amibianas con las que se ha correlacionado la virulencia de la amiba son: adhesinas, amiboporos, proteasas de cisteína y fosfolipasas. Si bien se han utilizado varios modelos animales para estudiar la enfermedad, entre los que se encuentra el absceso hepático en hígado de hamster, la posibilidad de cultivar trofozoitos de *E. histolytica* en condiciones axénicas trajo consigo el establecimiento de modelos *in vitro* de la enfermedad, en los que las células blanco se conservan en cultivo y se incuban con amibas o sus productos. Los estudios realizados en este tipo de modelos *in vitro* han sido especialmente útiles para examinar la capacidad invasora de este microorganismo.

El objetivo general de esta tesis es explorar el papel que desempeñan algunas moléculas amibianas en el daño que produce la amiba en las células de una monocapa de origen epitelial. Para ello, se usan inhibidores de las diferentes moléculas amibianas en cuestión y se cuantifica el daño producido sobre la monocapa, medido en términos de la resistencia eléctrica transepitelial de la misma. De los resultados obtenidos en esta primera etapa, surge el objetivo específico de esta tesis, que consiste en determinar el efecto producido por el complejo de lectina Gal/NAcGal, purificado a partir de trofozoitos amibianos axénicos, sobre la monocapa de células de origen epitelial.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II. MÉTODOS Y MATERIAL.....	20
CAPÍTULO III. RESULTADOS.....	45
CAPÍTULO IV. BIBLIOGRAFÍA.....	90

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

LA AMIBIASIS EN EL HOMBRE

- 1. EPIDEMIOLOGÍA**
- 2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD**

CARACTERÍSTICAS DE *Entamoeba histolytica*

- 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA**
- 2. CICLO DE VIDA DE *E. histolytica***
 - 2.1. EL Quiste**
 - 2.2 .El Trofozoito**
 - a) La membrana plasmática**
 - b) El citoplasma**
 - c) El núcleo**

PATOGENICIDAD DE *E. histolytica*

- 1. ACTIVIDAD CITOTÓXICA**
- 2. FACTORES DE VIRULENCIA**
 - 2.1.Los Amiboporos**
 - 2.2.Las Proteasas de Cisteína**
 - 2.3.Las Fosfolipasas**
 - 2.4.La Lectina Gal/NAc Gal**

LA LÍNEA CELULAR MDCK COMO MODELO EXPERIMENTAL

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE ESTA TESIS

JUSTIFICACIÓN

LA AMIBIASIS EN EL HOMBRE

La amibiasis humana es la enfermedad causada por el parásito *Entamoeba histolytica*. La patogenicidad y la virulencia de este parásito parecen variar en función de las condiciones ambientales, del estado general de salud del hospedero y otros factores más, de manera que su acción puede producir desde lesiones intestinales asintomáticas hasta infecciones más graves como la disentería e incluso amibiasis extraintestinal.

1. EPIDEMIOLOGÍA

La amibiasis es una enfermedad diarréica potencialmente mortal que se calcula afecta a 50 millones de individuos y causa 70,000-100,000 muertes por año a nivel mundial (1). La infección por *E. histolytica* es endémica en la mayoría de los países en desarrollo. En nuestro país un estudio serológico, con muestras colectadas entre los años 1987 y 1988, de todos los estados de la república, indicó que el 8.4% de los sueros fue reconocido por anticuerpos específicos a *E. histolytica* (2). En los Estados Unidos y otros países desarrollados, la mayoría de los casos son importados de inmigrantes o viajeros de las zonas endémicas.

2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

En la mayoría de los individuos la infección con *E. histolytica* es asintomática; sólo el 10% de los sujetos parasitados evoluciona hacia la enfermedad invasiva sintomática. Los individuos que se encuentran en mayor riesgo son muy jóvenes, de edad avanzada, mujeres embarazadas, pacientes tratados con corticosteroides y personas con desnutrición (3). No se ha encontrado mayor frecuencia o gravedad de la enfermedad en individuos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (4). La disentería amibiana se asocia frecuentemente con diarrea sanguinolenta, pus o tenesmo y dolor abdominal. Hay pérdida de peso, aunque la presencia de fiebre es rara. Si bien la incidencia de colitis amibiana está distribuida de igual manera entre individuos de sexo femenino que de masculino, los

abscesos hepáticos amibianos son diez veces más frecuentes en hombres adultos que en mujeres o niños (3). Los síntomas más frecuentes de absceso hepático son fiebre, tos, dolor abdominal y del cuadrante superior derecho, el cual puede ser agudo o subagudo. La mayoría de los pacientes no presentan colitis amibiana asociada a los abscesos, pero pueden tener en su historia colitis reciente.

CARACTERÍSTICAS DE *Entamoeba histolytica*

1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

E. histolytica tiene la siguiente clasificación taxonómica (5):

Phylum	Protozoa
Subphylum	Sarcomastigophora
Superclase	Sarcodina
Clase	Rhizopodea
Familia	Entamoebidae
Género	Entamoeba
Especie	histolytica

2. CICLO DE VIDA DE *E. histolytica*

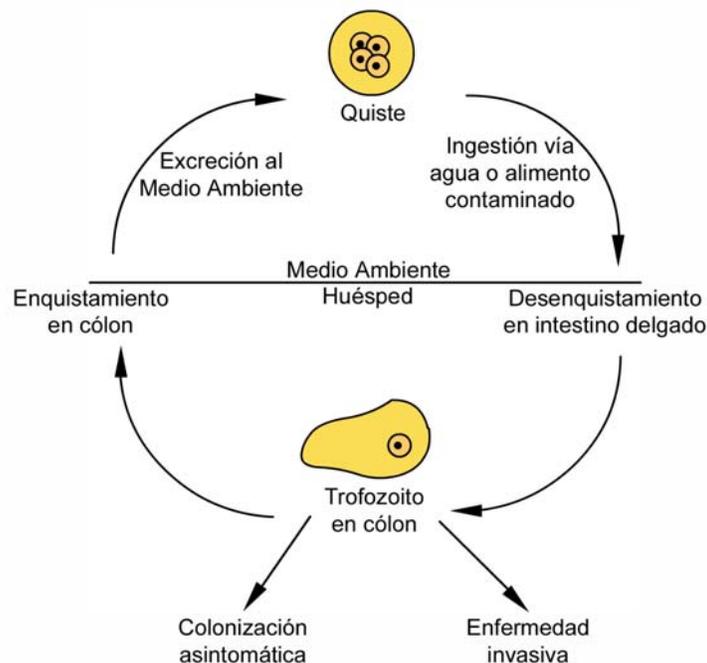


Fig. 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*. Adaptado de Mann & Loftus.(21)

E. histolytica se distribuye por una ruta fecal-oral (Fig. 1). Los quistes resistentes a las condiciones del medio ambiente se eliminan en las heces de individuos infectados. Las nuevas infecciones ocurren cuando se ingieren agua o alimentos contaminados. El parásito se desenquista en el intestino delgado, en donde se divide para dar lugar a su forma invasora: el trofozoito. Los trofozoitos colonizan el intestino grueso, donde pueden permanecer hasta 6 meses o más, aunque la mayoría son eliminados a los 12 meses (6). Algunos trofozoitos pueden enquistarse y ser excretados con las heces, comenzando así una nueva ronda de infección. También se eliminan quistes que no se convierten en trofozoitos.

2.1. El Quiste

El estudio de la forma quística del parásito se ha visto frenado por la imposibilidad de inducir la formación de quistes de *E. histolytica* en cultivo. La mayor parte de la información referente al proceso de enquistamiento-desenquistamiento proviene de estudios realizados con *Entamoeba invadens*, una especie de amiba que infecta reptiles (7). A diferencia de *E. histolytica*, *E. invadens* puede enquistar en cultivo mediante choque osmótico o privación de glucosa, entre otras cosas. El enquistamiento de *E. invadens* está mediado por galactosa y N-acetil glucosamina, ya que la adición de cualquiera de estos dos azúcares al medio inhibe el proceso (8). Se ha purificado una proteína muy abundante en la pared del quiste de *E. invadens*: la proteína Jacob (9), ésta es capaz de unirse tanto a residuos de quitina como de galactosa, desempeñando un papel fundamental en la formación de la pared del quiste.

2.2. El Trofozoito

La información existente sobre la biología de la amiba se ha derivado principalmente de estudios realizados con aislados patogénicos de *E. histolytica* crecidos en condiciones axénicas, siendo quizá el más utilizado, el aislado HM1:IMSS, que actualmente constituye una cepa virulenta (capaz de inducir abscesos en hígado de hámster).

La forma móvil de *E. histolytica*, el trofozoito, es una célula pleomórfica muy dinámica cuya forma y motilidad son muy sensibles a cambios de pH, temperatura, osmolaridad y potencial redox. En movimiento, el trofozoito presenta una forma alargada, con lobópodos salientes y una cola o uroide rastrero, mientras que en reposo presenta una forma esférica. El diámetro de la célula varía entre 10 y 60 μm . La superficie celular presenta numerosas aberturas de 0.2-0.4 μm de diámetro que corresponden a las bocas de vesículas micropinocíticas. El uroide aparece como una cola formada de pliegues irregulares de la membrana y procesos filiformes llamados filopodios (10).

a) La membrana plasmática

La membrana plasmática del trofozoito tiene un grosor de 10 nm y está recubierta de una capa uniforme de glicoproteínas. La unión de la lectina Concanavalina A a la superficie amibiana sugiere la presencia de un alto contenido de residuos de azúcares (10).

La interacción de la membrana plasmática del trofozoito con ligandos específicos induce una dramática redistribución de los componentes de superficie que se acumulan en el uroide para su posterior liberación al medio (11). En este “capping” de moléculas de superficie participan elementos de actina y miosina (12, 13).

b) El citoplasma

El citoplasma de *E. histolytica* se caracteriza por la ausencia de organelos diferenciados que están presentes en otras células eucarióticas, como son: mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, centriolos y microtúbulos. En vez de ellos, el citoplasma contiene mitosomas (14) y diferentes vesículas análogas a retículo endoplásmico y aparato de Golgi (15). Los lisosomas amibianos difieren de los de otros eucariotes en el sentido de que las enzimas contenidas en ellos se encuentran asociadas a la membrana lisosomal (16).

A pesar de la sorprendente motilidad y plasticidad del trofozoito, poco se conoce acerca de la organización estructural del citoesqueleto, sin embargo, se sabe que lo constituyen los siguientes componentes: actina (existen 4 genes para esta proteína) implicada en la formación de microfilamentos y miosina (proviene de un solo gene), relacionada con la formación del complejo de actomiosina (13).

Estudios de microscopía electrónica de transmisión han confirmado la ausencia de microtúbulos en amibas que no se están dividiendo (16), mientras que éstos están presentes en el núcleo de trofozoitos en división (17).

c) El núcleo

El núcleo de *E. histolytica* mide de 4-7 μm de diámetro. La membrana nuclear presenta numerosos poros de alrededor de 65 nm de diámetro y parece recubierta por una fina capa de numerosos gránulos, lo que hace que el núcleo tenga una apariencia anular en una sección óptica. Acúmulos de cromatina, por lo general uniformes en tamaño, se encuentran igualmente distribuidos hacia el interior de la membrana nuclear, aunque en algunos casos ésta se encuentra concentrada en una zona específica del núcleo (16). El cariosoma o endosoma es una pequeña masa esférica de 0.5 μm de diámetro, localizada en la parte central del núcleo. La división nuclear se lleva a cabo sin la disolución de la membrana nuclear e involucra la participación de gruesos husos de microtúbulos (16). Mediante técnicas de microscopía de luz y electrónica se ha estimado que el número de cromosomas varía entre 5-6 y 12-16 (18, 19, 20).

PATOGENICIDAD DE *E. histolytica*

En términos generales la patogenicidad de un microbio se define como la capacidad de éste para causar daño en un hospedero específico, mientras que su virulencia es el grado o medida en que lo produce.

La invasión de la mucosa intestinal por *E. histolytica* conduce a la formación de la característica úlcera en forma de matraz. Se cree que la migración subsecuente desde las lesiones en el colon hacia otros tejidos ocurre por vía sanguínea. Un rasgo característico de la invasividad y la patogenicidad es la habilidad de la amiba para adherirse, lisar (capacidad a la que debe su nombre) y fagocitar el epitelio intestinal y otros tejidos del hospedero.

1. ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Las amibas son capaces de causar la muerte en una gran variedad de células blanco, incluyendo macrófagos, linfocitos T, y neutrófilos, así como células epiteliales del colon (21). Dicha muerte es contacto-dependiente y requiere el funcionamiento de los microfilamentos de actina de la amiba (22). La muerte de la célula blanco por *E. histolytica* puede ocurrir por alguno de dos mecanismos: apoptosis o necrosis. Tras el contacto de la amiba con la célula blanco se detecta, en esta última, fragmentación del DNA y activación de la caspasa 3 (23, 24). Se ha descrito muerte celular apoptótica en el modelo de colitis amibiana y absceso hepático amibiano en ratón (24, 25, 26), esto último incluso en ratones carentes de la vía *Fas/Fas L o del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), sugiriendo ello, que dicha muerte por apoptosis ocurre por una vía diferente a las mencionadas (26). Por otra parte, se ha referido que el principal mecanismo de muerte inducida por las amibas sobre células Jurkat y la línea celular HL-60 es el de necrosis (27). Se desconoce si el mecanismo por el cual la amiba induce diferentes tipos de muerte tiene relación con la estirpe de la célula blanco; sin embargo, las moléculas implicadas en este proceso han sido los llamados factores de virulencia.

2. FACTORES DE VIRULENCIA

El término “factor de virulencia” cobra sentido cuando se analizan las interacciones hospedero-patógeno. En la literatura parasitológica se encuentran varias definiciones del término: para Smith (28), un factor de virulencia es aquel producto microbiano que permite al patógeno causar la enfermedad; mientras que para Wood y Davis (29) es un componente del patógeno cuya ausencia reduce la virulencia del mismo, aunque no su viabilidad; por último, para Henderson, Poole y Wilson (30) un factor de virulencia es aquel componente del patógeno que daña al hospedero; incluyendo los esenciales para la viabilidad del patógeno. Contenidas

*Fas es un miembro de la familia de receptores del TNF. La unión del ligando de Fas (Fas L) al receptor Fas induce apoptosis en la célula que expresa este receptor.

en este término estarían las modulinas, que producen daño en los tejidos del hospedero mediante la inducción de la síntesis de citocinas (31).

La investigación en el campo de la amibiasis se ha abocado al estudio de los factores de virulencia sin tomar en cuenta las distintas restricciones del concepto. Así, los principales factores de virulencia de la amiba (aquéllas moléculas que causan la muerte de las células de mamífero, así como la invasión de tejidos o la inducción de una respuesta inmunológica) que se han estudiado son: los amiboporos, las proteasas de cisteína, las fosfolipasas, y las adhesinas de la amiba.

A continuación mencionamos la información más relevante de estos factores.

2.1. Los Amiboporos

Los amiboporos son una familia de proteínas formadoras de poros, con un peso molecular de 8 kDa, capaces de formar canales de iones en membranas lipídicas y depolarizar las membranas de las células blanco (32, 33, 34). Los amiboporos son péptidos de alrededor de 77 residuos aminoacídicos, con tres enlaces disulfuro intramoleculares (35). Tres isoformas constituyen la familia de los amiboporos: A, B y C, los cuales comparten entre un 35-57% de homología, y se encuentran en una proporción de: 35:10:1 en la cepa HM1-IMSS (35). La estructura terciaria nativa del amiboporo A (36) revela un plegamiento de cinco hélices interconectadas por tres puentes disulfuro; este estudio y otros previos han permitido proponer la forma como el amiboporo actúa perforando a la célula blanco. El modelo propuesto consiste en un poro hexamérico que depende del pH, para su actividad permeabilizante; ésta radica en la protonación de un solo residuo de histidina de uno de los monómeros (a pH bajo, entre 4 y 6) que dispara la dimerización, proceso indispensable para su actividad. El resultado final sería la incorporación de otros dímeros hasta constituir una estructura hexamérica con rasgos hidrofóbicos en su exterior y predominantemente hidrofílicos en su interior (37).

El péptido activo ha sido localizado en gránulos citoplásmicos en el interior de la amiba (38) y éste no se secreta al medio (39). Andra J. y cols. (40) han propuesto

que la principal función de los amiboporos es la de perforar bacterias ingeridas por la amiba, (que se encuentran secuestradas en el fagosoma), y que servirán como fuente de nutrientes para la misma. Los amiboporos puros en altas concentraciones tienen un efecto citolítico sobre algunos tipos de células eucarióticas (41).

Mediante técnicas de biología molecular, como RNA de interferencia (en las que se inserta un gene “antisentido”), ha sido posible inhibir hasta en un 60% la expresión del amiboporo A en la amiba, dando como resultado una disminución en la citotoxicidad de la misma ante células bacterianas y eucarióticas; inclusive, la capacidad de estas amibas transformadas para formar abscesos hepáticos en hámster es menor con respecto a la de la cepa original (HM1-IMSS) (42). Bracha y cols. generaron una cepa genéticamente modificada (carente por completo de amiboporo A) (43), la cual resultó incapaz de inducir la formación de abscesos en animales experimentales, aún con inóculos de un millón de amibas (44); sin embargo, el amiboporo no parece ser indispensable para la inducción de inflamación en un modelo experimental de colitis amibiana (45).

2.2. Las Proteasas de Cisteína

Las proteasas de cisteína de la amiba pertenecen a la superfamilia de la papaína; se sintetizan inicialmente como proenzimas y su especificidad por el sustrato es similar a la de la catepsina B. Hasta el año 2003 se habían identificado 20 genes en la amiba que codifican para proteasas de cisteína (EhCP1-19; EhCP112) (46); todos estos genes codifican para proteasas de cisteína con pesos moleculares calculados entre 24 y 35 kDa, que comparten 40-85% de homología. Aparentemente, del total de las proteasas, las responsables de más del 90% de la actividad enzimática *in vitro* son tres (EhCP1, EhCP2 y EhCP5) y el resto se expresa muy poco o no se expresa en condiciones de cultivo axénico (47). Los estudios realizados *in vitro* han demostrado que las proteasas de cisteína se secretan al medio (39); sin embargo, al examinar cortes de hígado de hámster con absceso hepático amibiano experimental agudo (1 y 5 días), utilizando un anticuerpo policlonal de conejo antiEhCP2, se detectó la presencia de esta

proteasa amibiana en el interior de las amibas, inclusive en la membrana plasmática de éstas, pero no en el exterior (en las estructuras necróticas del hígado) (48). De las EhCPs más estudiadas, sólo CP5 y CP112 están asociadas a la membrana (49, 50). Se ha sugerido que la capacidad de las proteasas de cisteína de degradar IgA, IgG, así como anafilatoxinas del complemento (C3a y C5a), constituye un mecanismo de evasión de la respuesta inmune que monta el hospedero contra el parásito (51).

Las proteasas de cisteína han sido consideradas, en gran medida, las moléculas responsables del daño celular y tisular producido por la amiba, tanto en infecciones humanas como experimentales (46, 51, 52). En la literatura se encuentran informes de experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* que apoyan dicha consideración: una proteasa de cisteína de 30 kDa, purificada a partir de HM1-IMSS cultivada axénicamente, tuvo un efecto citolítico sobre hepatocitos muertos de rata y hámster, siendo este efecto inhibible por E64 un inhibidor específico e irreversible de proteasas de cisteína (53); la disminución de la expresión de EhCP5 en *E. histolytica* mediante técnicas de mRNA “antisentido” se correlacionó con una disminución en la fagocitosis, aunque el efecto citopático y la actividad hemolítica permanecieron sin alteración (54); los trofozoitos de *E. histolytica* cultivados axénicamente en presencia de E64 mostraron una disminución en su capacidad de producir abscesos en el hígado de ratones inmunodeficientes (SCID) (55); la disminución en la expresión de EhCP5 en *E. histolytica* se correlacionó con una disminución en la capacidad de las amibas para inducir abscesos hepáticos en hámsters (56), así como con una disminución en la inflamación, en la producción de IL-2 e IL-8 y en la capacidad de convertir pro-IL-1 a IL-1 en el trasplante de intestino humano en ratones SCID (57). Utilizando amibas cultivadas en presencia de E64 como inóculo en un modelo de absceso hepático amibiano en hámsters, se demostró que la actividad enzimática en estas amibas no se requiere para sus funciones en condiciones *in vitro*, sin embargo, es necesaria para la supervivencia de los trofozoitos en condiciones *in vivo* (58).

2.3. Las Fosfolipasas

Quizá la primera alusión a la presencia de una fosfolipasa A amibiana implicada en la citopatogenicidad de *E. histolytica* corresponda al trabajo realizado por Ravdin *et al* (59), quienes estudiaron el efecto patogénico de trofozoitos de la cepa HM1:IMSS tratados con bloqueadores específicos de canales de Na⁺ sobre células CHO (Chinese Hamster Ovary) en cultivo, encontrando que los bloqueadores de canales lentos de Na⁺ y de Ca⁺²: el verapamilo y el bepridil, inhibían dicho efecto de la amiba sobre las células blanco, no así la tetrodotoxina, el bloqueador de canales rápidos de Na⁺. Este resultado sugirió que el daño producido por la amiba estaba relacionado con las concentraciones de calcio internas, lo que condujo a este grupo de trabajo a proponer la participación de una fosfolipasa A amibiana dependiente de calcio. Algunos antagonistas de la actividad de fosfolipasa A amibiana, tales como el inhibidor de Rosenthal y la fosfatidilcolina bloquearon la citólisis producida por trofozoitos intactos sobre células CHO (60). En 1985, Long-Krug *et al* (61) trabajando con fracciones subcelulares amibianas, encontraron dos tipos de actividad de fosfolipasa A: una independiente de calcio con máxima actividad a un pH de 4.5, y otra, de menor actividad dependiente de calcio, con óptima actividad a pH de 7.5. Mientras que la actividad de fosfolipasa dependiente de calcio se encontró asociada a membrana plasmática, la actividad independiente de calcio se asoció predominantemente a la fracción soluble de la preparación amibiana. Puesto que la actividad de la enzima dependiente de calcio resultó ser inhibible por el inhibidor de Rosenthal, estos investigadores sugirieron que la fosfolipasa A dependiente de calcio desempeña un papel importante en la actividad citolítica de la amiba sobre las células blanco. Teniendo como antecedente un estudio de los requerimientos lipídicos para el cultivo axénico de *E. histolytica*, en el que se demostró que el suplemento de colesterol al medio de cultivo estimula la multiplicación amibiana (62), Misra *et al* detectaron actividad de fosfolipasa A tanto en trofozoitos de *E. histolytica* cepa NIH-200 en cultivo, como en el medio del mismo; dicha actividad se incrementó en los cultivos suplementados con colesterol. Mediante cromatografía de filtración molecular se purificó la fracción que albergaba la actividad de fosfolipasa A. La

fracción así purificada, proveniente de membrana, al ser analizada mediante electroforesis desnaturante (por la presencia de sodio dodecil sulfato -SDS-) en geles de poliacrilamida (PAGE), resultó estar constituida por dos bandas: una con máxima actividad a pH 4.2 y la otra, a pH 9.0. La incorporación de aminoácidos marcados radiactivamente en las proteínas en las diferentes etapas a lo largo de la purificación mostró que el paso del cultivo por colesterol incrementaba la síntesis y actividad de fosfolipasa A en los trofozoitos (63).

Vargas Villarreal y cols. identificaron, en 1995 (64), actividad de fosfolipasa A y de lisofosfolipasa L₁ en una fracción subcelular membranosa (llamada P30) proveniente de cultivos axénicos de *E. histolytica* de la cepa HK9. Más tarde, mediante cromatoelectroenfoque de la fracción insoluble en éter de P30, seguida de cromatografía de afinidad (inhibidor de Rosenthal acoplado a sefarosa) el mismo grupo de trabajo aisló la fosfolipasa A₂ intracelular de *E. histolytica* HK9, en su forma dimérica, teniendo cada subunidad monomérica un peso molecular de 15 kDa (65).

Es importante hacer hincapié en que la información relativa a la actividad de fosfolipasa proviene de estudios realizados en diferentes cepas de *E. histolytica*.

2.4. La Lectina Gal/NAcGal

Un paso esencial en el proceso citopatogénico es la adherencia del parásito a la célula blanco. Los primeros estudios de la adherencia de la amiba a las células blanco revelaron que el pretratamiento de la amiba con galactosa (Gal) o N-acetilgalactosamina (NAcGal), bloqueaba tanto la adherencia de la amiba, como la citólisis inducida por el parásito en la célula blanco (66, 67). La molécula amibiana implicada resultó ser una lectina que se llamó: lectina inhibible por galactosa o N-acetilgalactosamina (lectina Gal/NAcGal), localizada en la membrana plasmática del trofozoito, fue purificada por cromatografía de afinidad de galactosa a partir de un extracto amibiano (68). La proteína, proveniente de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS, está glicosilada, y en su estado nativo migra en geles de poliacrilamida-SDS como una proteína de peso molecular de 260 kDa, mientras que en condiciones reductoras con β-mercaptoetanol, la lectina se disocia para dar

lugar a dos subunidades: una pesada (H) de 170 kDa y una ligera (L) de 31-35 kDa (69).

La subunidad pesada de la lectina Gal/NAcGal ha sido secuenciada (70) y se sabe que está constituida por 1291 residuos aminoacídicos, de los cuales, 26 corresponden al dominio transmembranal, 41 al dominio citoplásmico, y el resto corresponde a la región extracelular, rica en residuos de cisteína, en la que se encuentra el dominio de reconocimiento del carbohidrato (CRD) (71). La familia de genes de la subunidad pesada está constituida por cinco genes, cuyos productos muestran una homología del 89-95% (71).

La subunidad ligera está representada también por 6-7 genes que codifican isoformas con diferentes modificaciones postraduccionales y que muestran un 79-85% de homología entre ellos. Las principales isoformas: la de 35 y 31 kDa tienen prácticamente la misma composición aminoacídica (72, 73) aunque la isoforma de 35 kDa carece de la terminación de acil-glicosil-fosfatidilinositol (ancla GPI) presente en la isoforma de 31 kDa. Dicha terminación permite la asociación de esta subunidad a la membrana plasmática y su presencia parece ser indispensable para la formación del heterodímero H-L (74).

La subunidad intermedia (I), también conocida como la lectina de 150 kDa, originalmente descrita por Tachibana y colaboradores, se encuentra asociada al heterodímero de 260 kDa aunque de manera no covalente (75). Inicialmente identificada como “blanco” de anticuerpos monoclonales que bloquean la adherencia de los trofozoitos, se ha demostrado que esta subunidad está íntimamente asociada a Gal/NAcGal en diferentes formas: a) la subunidad intermedia se encuentra presente en preparaciones de Gal/NAcGal pura, obtenida tanto por cromatografía de afinidad de galactosa como por cromatografía de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales anti-H, b) de manera similar, la subunidad pesada está presente en pequeñas cantidades en muestras de la subunidad I purificada mediante cromatografía de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales anti-I (76). La subunidad I también se encuentra en la membrana plasmática del trofozoito y colocaliza con las subunidades H y L de la lectina Gal/NAcGal (77). Se han clonado cuando menos dos genes para la subunidad

intermedia, éstos codifican proteínas que comparten un 84% de homología aminoacídica y que carecen de CRD, pero tienen similitud con las glicoproteínas variantes de superficie (VSPs) de *Giardia lamblia* (77), en cuanto que presentan secuencias CXXC y CXC.

La disponibilidad de diversos anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes epítopes de la subunidad pesada permitió realizar estudios sobre la participación de los diferentes dominios de la subunidad pesada en la adherencia de la amiba. En su mayoría, los anticuerpos inhibieron la adherencia de los trofozoitos amibianos a mucinas de colon humano; sin embargo, cuando menos dos de ellos la incrementaron (78). La interpretación de estos resultados consistió en que la lectina sufre cambios conformacionales asociados a su unión al ligando. Dicho planteamiento se vió sustentado por estudios en los que se sobreexpresó el dominio citoplásmico de la subunidad H en trofozoitos, mismo que contiene regiones de identidad con la cola citoplásmica de los dominios de $\beta 2$ integrinas, lo que resultó en un decremento del 50% en la adherencia a las células blanco (79). Ciertas mutaciones en los residuos conservados del dominio citoplásmico anulaban el efecto observado, planteando la posibilidad de que la lectina amibiana comparta con las integrinas un mecanismo similar de “transducción de señales de adentro hacia fuera”.

Se ha atribuído a la lectina un papel importante en la citotoxicidad de la amiba frente a diversas células blanco: la aposición de las membranas de la amiba y de la célula blanco, tal como ocurre en el botón obtenido al centrifugar una suspensión de ambas células, no conduce a la citólisis si la lectina amibiana se inhibe con galactosa (Gal) o N-acetil-Galactosamina (NAcGal) (80), ni tampoco si la célula blanco carece de este tipo de azúcares en su superficie (81, 82). Estos datos son consistentes con la idea de que la lectina no sólo es una mediadora de la adherencia, sino que participa en el evento citolítico. La identificación de un anticuerpo monoclonal anti-lectina, dirigido contra el epítope 1 de la subunidad pesada de la lectina, que bloqueó la citotoxicidad pero no la adherencia, constituye otra prueba de que la lectina está implicada en el evento citotóxico (83). El mismo anticuerpo monoclonal que bloqueó la citotoxicidad produjo un cambio

conformacional en la lectina que aumentó la capacidad de unión al azúcar. Se ha especulado en relación a si el anticuerpo bloquea la citotoxicidad al prevenir un segundo cambio conformacional en la lectina, requerido éste para producir la muerte de la célula blanco. Al parecer, el efecto citotóxico de la amiba sobre la célula blanco requiere de la presencia de oligosacáridos “O-linked” * en la superficie de la célula blanco (81, 82, 84).

La primer prueba de que el sitio de reconocimiento del azúcar (CRD) se encuentra en la cadena pesada provino de la observación de que anticuerpos monoclonales dirigidos contra ella, alteraban la actividad de ligando a Gal/NAcGal.

La neutralización de diversos epítopes en la subunidad pesada por los anticuerpos monoclonales permitió determinar que todos ellos se encontraban en la región rica en residuos de cisteína (aminoácidos 482-1138). Los anticuerpos que bloqueaban o aumentaban la capacidad de unión al azúcar se mapearon entre los residuos 482-818, sugiriendo que el CRD se encuentra en esta región del dominio rico en cisteína (85). Petri y colaboradores concluyeron que el CRD estaba localizado entre los residuos 895-998 de la subunidad de 170 kDa (86). Este grupo unió NAcGal₁₉BSA a la lectina recombinante producida en un sistema de expresión en bacterias. El fragmento 895-998 fue inmunoreactivo a un anticuerpo monoclonal inhibidor de la adherencia y se unió a NAcGal₁₉BSA de manera inhibible por NAcGal, sugiriendo la presencia de un CRD. De especial interés, tratándose de un parásito que muestra cierto tropismo por el hígado, resultó el hallazgo de que el CRD tenía identidad con la secuencia del receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF-R). Por otra parte, otros investigadores encontraron que: si bien el CRD se encuentra en la región rica en residuos de cisteína, los residuos 356-480 y/o 900-1143 son los requeridos para una unión de alta afinidad con el azúcar (87). Aún no se ha resuelto por completo si existe más de un sitio de reconocimiento de carbohidrato.

*Son glicanos O-linked, aquellos residuos glicosídicos que contienen un residuo de N-acetilgalactosamina en su terminación reductora. Este residuo de N-acetilgalactosamina está unido a un grupo hidroxilo de un residuo de serina o treonina de la cadena peptídica.

Estudios realizados con trofozoitos manipulados genéticamente (inhibiendo la expresión de un gen mediante RNA antisentido, o bien, transfectados con el gene para la cadena ligera, ya sea normal, mutado o truncado) han mostrado que la subunidad L de la lectina se requiere para la adhesión y virulencia del parásito así como para su efecto citopático sobre la célula blanco (88, 89). Por otra parte, como ya se había mencionado, el dominio citoplásmico de la cadena H de la lectina parece ser también muy importante en esas mismas actividades del parásito (79), así mismo, se ha referido que esta subunidad desempeña un papel crucial en la invasión tisular por el parásito, sobre todo, en lo que respecta a la migración de *E. histolytica* en la estructura tridimensional del parénquima hepático (90, 91).

La familia de genes de la lectina Gal/NAcGal participa también en la evasión del sistema de complemento en el humano, ya que la subunidad H comparte identidad con la secuencia aminoacídica del inhibidor de la formación del complejo de ataque de membrana (MAC o CD59) (92, 93).

Es importante mencionar que a partir de la identificación de la subunidad intermedia en 1998, el concepto de que la lectina Gal/NAcGal estaba constituida por una proteína heterodimérica de peso molecular de 260 kDa ha sido sustituido cada vez más por el de un complejo de varias proteínas que actúan en conjunto y que intervienen en diversos procesos de la amiba.

LA LÍNEA CELULAR MDCK COMO MODELO EXPERIMENTAL

Nuestro modelo experimental consistió en una monocapa de células epitelioides de la línea celular de origen renal MDCK como células blanco sobre las cuales se estudió el daño ejercido por trofozoitos de *E. histolytica*. Funcionalmente, la monocapa de células MDCK cultivada sobre un soporte permeable (filtros de Millipore), se comporta como un epitelio en el sentido de que desarrolla una resistencia eléctrica transepitelial (RET), característica del epitelio de túbulo contorneado distal de riñón (94); dicha resistencia transepitelial correlaciona con el grado de sellado de los espacios intercelulares mediante las uniones estrechas y

por ende, con la integridad de la monocapa. Es en este modelo que se ha descrito de manera cuantitativa la lesión celular *in vitro* más temprana; esto es, la disminución de la resistencia eléctrica transepitelial de monocapas de células MDCK al entrar en contacto con trofozoitos axénicos de la cepa HM1:IMSS, lesión detectada a tan solo 2 minutos de coincubación (95). Por otra parte, es posible llevar a cabo un análisis por simple microscopía de fase de la monocapa, cuando ésta se ha desarrollado sobre un soporte no permeable.

Se han realizado numerosos estudios relacionados con la adherencia de la amiba utilizando esta línea celular como célula blanco (96-101). También ha sido utilizada para evaluar la capacidad invasiva de células de carcinoma humano (102). Esta línea celular ha sido de gran utilidad para realizar estudios relativos a la biogénesis de las uniones estrechas (estructuras intercelulares que parecen estar implicadas en procesos invasivos), y de la polaridad epitelial (103).

por ende, con la integridad de la monocapa. Es en este modelo que se ha descrito de manera cuantitativa la lesión celular *in vitro* más temprana; esto es, la disminución de la resistencia eléctrica transepitelial de monocapas de células MDCK al entrar en contacto con trofozoitos axénicos de la cepa HM1:IMSS, lesión detectada a tan solo 2 minutos de coincubación (95). Por otra parte, es posible llevar a cabo un análisis por simple microscopía de fase de la monocapa, cuando ésta se ha desarrollado sobre un soporte no permeable.

Se han realizado numerosos estudios relacionados con la adherencia de la amiba utilizando esta línea celular como célula blanco (96-101). También ha sido utilizada para evaluar la capacidad invasiva de células de carcinoma humano (102). Esta línea celular ha sido de gran utilidad para realizar estudios relativos a la biogénesis de las uniones estrechas (estructuras intercelulares que parecen estar implicadas en procesos invasivos), y de la polaridad epitelial (103).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS DE ESTA TESIS

A lo largo de esta introducción hemos mencionado la información considerada más relevante para el planteamiento de la hipótesis y el objetivo general de este estudio.

HIPÓTESIS INICIAL

En la lesión temprana que producen los trofozoitos amibianos a una monocapa de células MDCK, participan de igual manera todos los factores de virulencia de la amiba (la lectina Gal/NAcGal, las proteasas de cisteína, la fosfolipasa dependiente de calcio y los amiboporos).

1. OBJETIVO GENERAL

Cuantificar en términos de resistencia transepitelial el daño que produce *E. histolytica* en una monocapa de células MDCK, así como determinar el papel que desempeña cada uno de los factores de virulencia: la lectina Gal/GalNAc, las proteasas de cisteína, la fosfolipasa dependiente de calcio y los amiboporos, en el mismo.

Al desarrollar el objetivo general, los resultados obtenidos nos condujeron a proponer la siguiente hipótesis secundaria, así como un objetivo específico para la segunda parte de esta tesis:

HIPÓTESIS SECUNDARIA

La lectina amibiana Gal/NAcGal induce en el contacto inicial con las células de la monocapa la apertura de sus uniones estrechas y como consecuencia una mayor permeabilidad paracelular que se refleja en una disminución de la RET de la monocapa.

Para probar esta hipótesis, elaboramos el siguiente objetivo específico.

2. OBJETIVO ESPECÍFICO

Purificar la lectina Gal/GalNAc y determinar el efecto que tiene ésta en la RET de una monocapa de células MDCK, de manera que podamos definir su función, y determinar si ésta va más allá del simple reconocimiento de residuos de galactosa en la superficie de las células de origen epitelial.

JUSTIFICACIÓN

Entamoeba histolytica, como su nombre lo indica, es un parásito entérico con una capacidad sorprendente para lisar los tejidos del hospedero. Sin embargo, la interacción del parásito con el hospedero es mucho más compleja que la sola destrucción e invasión. Es precisamente en la interface del hospedero-parásito que eventos de señalización celular determinan que el parásito: (a) infecte en forma no invasiva, como comensal, (b) se transforme de trofozoito a quiste, o (c) invada y potencialmente cause la muerte del hospedero. De ahí la importancia del estudio de las moléculas involucradas en estos procesos.

Algunos estudios realizados en modelos *in vitro*, han coincidido con lo observado en modelos *in vivo*; por ejemplo, se ha referido la transferencia de Gal/NAcGal de la amiba a enterocitos, hepatocitos humanos y de hámster en cultivo (104, 105),

por otra parte, la distribución de esta lectina amibiana en las células del hospedero en los modelos *in vivo* de absceso hepático amibiano en hámster (105, 106) y de amibiasis intestinal en ratón (105). Además, los modelos *in vitro* como son las monocapas de tejidos en cultivo constituyen un sistema experimental idóneo para el estudio de la capacidad invasora de este parásito, ya que permiten el análisis de las interacciones, a nivel molecular entre una célula “invasora” (la amiba) y la “normal” (el tejido en cultivo). Se ha referido una disminución en la RET de monocapas de T84 tras la incubación de éstas con *E. histolytica*, detectándose alteraciones en las proteínas constituyentes de las uniones estrechas (las proteínas ZO) (107).

La invasión no es un proceso exclusivo a algunos microorganismos, ésta se presenta en algunas células cancerígenas que se trasladan de su lugar de origen hacia otro(s) tejido(s), proceso conocido como metástasis. Se ha propuesto que los trofozoitos amibianos siguen la misma ruta metastásica que las células cancerígenas al invadir los tejidos (108). En cualquier caso, (la invasión de tejidos por microorganismos o por células cancerígenas) las interacciones entre las moléculas de adhesión de las células son determinantes; de manera que la contribución de este proyecto estriba en la profundización del conocimiento de las moléculas de adhesión implicadas en procesos patológicos, lo que a su vez quizá permita en un futuro el diseño de medidas terapéuticas que sean extensibles a diversas patologías.

CAPITULO II

MÉTODOS Y MATERIAL

CULTIVO AMIBIANO.....	22
1. CULTIVO AXÉNICO DE LA CEPA HM1: IMSS VIRULENTA.....	22
1.1. Cosecha de Trofozoitos.....	22
1.2. Tratamiento de Trofozoitos con Inhibidores.....	22
1.3. Cultivo Masivo de Trofozoitos.....	23
2. CULTIVO AXÉNICO DE LA CEPA HM1:IMSS NO VIRULENTA.....	24
CULTIVO DE CÉLULAS.....	24
1. CULTIVO MASIVO DE CÉLULAS MDCK.....	24
1.1.La Monocapa Desarrollada sobre un Soporte Permeable	
para Determinaciones de RET.....	25
1.2.La Monocapa Desarrollada sobre un Soporte no Permeable	
para Estudios de Microscopía.....	25
1.2.1.Tinción con nitrato de plata.	25
DETERMINACIÓN DE LA RET.....	25
1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES.....	26
DETERMINACIONES DE OSMOLARIDAD.....	29
ESTADÍSTICA.....	29
PURIFICACIÓN DE LA LECTINA GAL/NAcGAL.....	29
1. PURIFICACIÓN DE LA LECTINA POR	
MICROELECTROELUCIÓN DESNATURALIZANTE	30
2. PURIFICACIÓN DE LA LECTINA MEDIANTE	
MACROELECTROELUCIÓN DESNATURALIZANTE.....	31

2.1. Secuenciación Aminoacídica e Identificación de la Fracción 23.....	31
3.PURIFICACIÓN DE LA LECTINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD.....	32
3.1. Obtención de Anticuerpos Policlonales de Conejo contra Gal/NAcGal	32
3.1.1. Inmunización de los conejos.....	32
3.1.2. Purificación de IgG's del suero de los conejos C₂₂ y C₂₃.....	33
3.2. Acoplamiento de IgG's del C₂₂ a un Soporte de Cromatografía: AFFI-GEL 10	34
3.3. Purificación de la Lectina Mediante Cromatografía de Inmunofinidad.....	34
 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.....	 35
 ENSAYOS DE HEMAGLUTINACIÓN.....	 35
 INMUNOTRANSFERENCIA.....	 36
 MEDIOS Y SOLUCIONES.....	 38
 REACTIVOS.....	 39
 TABLAS.....	 41

CULTIVO AMIBIANO

1. CULTIVO AXÉNICO DE LA CEPA HM1: IMSS VIRULENTA

Los trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS fueron cultivados axénicamente en medio TYI-S-33 suplementado (CTYI) (109), a 37 °C en condiciones anaeróbicas. Para los experimentos se utilizaron amibas provenientes de cultivos de 72 horas, (parte final de la fase logarítmica de crecimiento). La virulencia de las amibas se define en nuestro laboratorio como la habilidad de producir múltiples abscesos hepáticos con un inóculo de 5×10^5 trofozoitos, en 4/4 hamsters (de 100 g), 7 días después de su inyección intraportal. En nuestro laboratorio, para mantener la virulencia del cultivo, de rutina, cada 15 días se pasa el cultivo axénico por hígado de hámsters, recuperando los parásitos 7 días más tarde, a partir de los abscesos hepáticos y recomenzar así el cultivo (110).

1.1. Cosecha de Trofozoitos

Para la realización de los experimentos, los trofozoitos desprendidos de la botella de cultivo por enfriamiento (5 minutos sobre hielo) se sedimentaron a 2,000 rpm durante 5 minutos, se descartó el medio y el botón amibiano se resuspendió en un amortiguador salino de fosfatos, pH 7.2 (PBS-A), mismo en el que se realizó un lavado adicional. La viabilidad de los trofozoitos se determinó por exclusión de azul tripán.

1.2. Tratamiento de Trofozoitos con Inhibidores

Los inhibidores se prepararon en medio CTYI-S-33 a las concentraciones que se indican:

- a) α -2-macroglobulina 4.2×10^{-4} M (111)
- b) E-64 5×10^{-4} M
- c) Inhibidor de Rosenthal 10^{-3} M (112)

- d) Verapamil 10^{-4} M
- e) Bepridil 10^{-5} M
- f) Galactosa 180 mM

Los trofozoitos cosechados como se indicó anteriormente, fueron tratados con el inhibidor en cuestión durante 1 hora previa su coincubación con las monocapas. La coincubación duró 30 minutos (en el mismo medio), y entonces se determinó la RET. En cada caso, la viabilidad de las amibas se monitoreó al cabo de una hora y media de incubación con el inhibidor en cuestión mediante exclusión de azul tripán.

La inhibición de la actividad proteolítica por el tratamiento de las amibas durante hora y media con 4.2×10^{-4} M de α -2-macroglobulina fue determinada mediante zimografía en gelatina y resultó ser del 40%.

La actividad enzimática de las amibas tratadas con el inhibidor E-64 se determinó colorimétricamente usando como sustrato azocaseína, tal como lo refiere Becker y cols. (113) así como por zimografía en gelatina; en la mayoría de los experimentos, las determinaciones colorimétricas indicaban una inhibición total mientras que, la actividad enzimática determinada mediante zimografía en geles de gelatina indicó estar parcialmente inhibida, desde un 90% hasta un 50% del valor normal.

El grado de inhibición de la actividad de fosfolipasa en las amibas tratadas durante una hora con el inhibidor de Rosenthal se determinó utilizando como sustrato: L-3-fosfatidilcolina, 1 palmitoil-2-[$1-^{14}\text{C}$] palmitoil. La presencia de oleato ^{14}C en el sobrenadante se cuantificó 24 horas después, de acuerdo a la técnica de Lumb y cols. (114). Se probaron dos concentraciones del inhibidor de Rosenthal: 10^{-3} y 10^{-4} M y en cualquier caso, la actividad de fosfolipasa resultó estar inhibida en un 50%.

1.3. Cultivo Masivo de Trofozoitos.

Para la purificación de la lectina se utilizaron botones amibianos de $\sim 2 \times 10^8$ trofozoitos, que se obtuvieron de cultivos masivos de amibas en tubos de vidrio (con una capacidad de aproximadamente 1.5 L), al inocular 3×10^7 trofozoitos en

1 L de medio; al cabo de 72 horas de incubación a 37 °C, las amibas se cosecharon como ya se mencionó y los botones fueron almacenados a -70 °C hasta su uso.

2. CULTIVO AXÉNICO DE LA CEPA HM1:IMSS NO VIRULENTA

La cepa HM1:IMSS no virulenta deriva de un cultivo de la cepa HM1:IMSS que ha perdido la capacidad de producir abscesos hepáticos en animales experimentales susceptibles, como gerbos o hámsters. Esta condición se presenta en cultivos axénicos prolongados de HM1:IMSS, y constituye para el investigador un sistema idóneo para realizar estudios comparativos entre ambas variedades “virulenta” y “no virulenta”, puesto que ambas provienen de la misma cepa.

En nuestro laboratorio se cultivan ambas variedades de la cepa HM1:IMSS en las mismas condiciones, con la diferencia de que la no virulenta no se pasa por hígado de hámster.

CULTIVO DE CÉLULAS

1. CULTIVO MASIVO DE CÉLULAS MDCK.

La línea celular MDCK que se utilizó fue la NBL-2 obtenida del laboratorio de In Vitro, S.A, México (No. de Catálogo LC-12). En la mayoría de los experimentos las células se encontraban entre los pasajes 75-90. Las células se hicieron crecer en botellas T-75 a 37 °C en DMEM suplementado (CDMEM) en una atmósfera de aire-5% CO₂. Las células se colectaron tras 2 lavados con PBS sin calcio (Gibco BRL Num. Cat. 21300-017), y tripsina-EDTA (Microlab Num. Cat. D-8410), y el medio conteniendo las células de la monocapa se centrifugó a 500 rpm durante 1 a 2 minutos; el botón con las células se resuspendió en CDMEM para su cuenta en la cámara de Neubauer para llevarse enseguida a la densidad deseada.

La Monocapa Desarrollada sobre un Soporte Permeable para Determinaciones de RET

Para las determinaciones de RET, las monocapas de células MDCK se formaron sembrando 5×10^5 células/cm² sobre filtros de Millipore de 45 µm previamente esterilizados (No. de Catálogo HAWPO 1300). Para ello, se colocó un filtro/pozo en una multicámara de 24 pozos. Después de incubar durante 90 minutos a 37 °C en una atmósfera de aire-5% CO₂ con humedad constante para permitir la adhesión de las células al soporte, los filtros se transfirieron a otra multicámara conteniendo medio fresco.

La Monocapa Desarrollada sobre un Soporte no Permeable para Estudios de Microscopía

Para los experimentos en los que el daño producido por las amibas sobre las monocapas de MDCK se analizó mediante microscopía óptica, las células se sembraron sobre cubreobjetos redondos de vidrio (Knutell, 18 mm) previamente lavados y esterilizados, a la misma densidad que para los experimentos de RET. Para ello, cada cubreobjetos se colocó en un pozo de una multicámara de 12 pozos, después se sembró siguiendo el mismo procedimiento que se describió en el punto número 1.1.

Tinción con nitrato de plata

Las monocapas control se tiñeron con nitrato de plata siguiendo la técnica de Samuels y cols. (115). Brevemente, después de un lavado con PBS con Ca⁺², las monocapas se incubaron con nitrato de plata (1:250 p/v) durante 1 minuto; pasado este tiempo se lavó y se fijó en formaldehído al 3.7% en PBS durante 12-18 horas. Las monocapas se contratiñeron con hematoxilina y se montaron en resina sintética.

DETERMINACIÓN DE LA RET

Las determinaciones de resistencia eléctrica transepitelial se hicieron tal como se indica en López-Vancell y cols (116). Brevemente: se utilizó una cámara de Ussing

(Taller Mecánico Industrial) que consiste en 2 compartimentos de lucita (con una capacidad de 1.1 ml) comunicados uno con el otro mediante un orificio con un área de 0.2827 cm^2 , el filtro sobre el que se desarrolló la monocapa se coloca como una hoja entre ambos compartimentos. A la parte más externa de cada una de las cámaras de lucita llega un electrodo en placa, éste constituye el electrodo inyector de corriente, mientras que en la parte interna, justo en la vecindad de la monocapa se encuentran los electrodos de Ag/AgCl_2 que detectan el potencial eléctrico a través de la monocapa. Los electrodos están conectados a un multímetro. En estos experimentos la solución en ambas cámaras fue DMEM; la diferencia de potencial entre los electrodos antes de iniciar el experimento era siempre de 0.2 mV; esto se checó rutinariamente sumergiendo ambos electrodos en una misma cámara a una distancia uno de otro igual a la que se encontraban en las cámaras de lucita. Se grabó la deflexión de voltaje producida por el paso de una corriente de $20 \mu\text{A cm}^{-2}$. En todos los valores de resistencia calculados se sustrajo la contribución de los electrodos, la solución y el filtro sin la monocapa. La resistencia se calculó a partir de la Ley de Ohm, siendo conocidos el potencial transepitelial (V) y la corriente aplicada (I):

$$R = V/I \times A$$

Donde:

R = resistencia eléctrica transepitelial (RET)

A = área expuesta

1. DETERMINACION DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES

Para elegir las condiciones experimentales fue necesario hacer los siguientes ensayos:

- a) Estudio del curso temporal de la RET en nuestras células MDCK. Para llevar a cabo este ensayo, se sembraron 4 filtros/cada tiempo con MDCK a confluencia (densidad de 5×10^5 células/ cm^2). Se determinó la resistencia de las monocapas en formación a las 6, 11, 16, 21, 24 y 29 horas después de sembradas las células. La figura 2 muestra los resultados obtenidos. El

curso temporal de esta cepa resultó ser muy similar al informado por González-Mariscal y colaboradores (117) para la línea MDCK directamente adquirida de la American Type Culture Collection. La resistencia alcanza un valor máximo a las 21 horas después de sembradas las células, manteniéndose constante en estos valores hasta las 26 horas, para después decaer un poco a las 29 horas. Como conclusión de este estudio, las monocapas de MDCK se sembraron a confluencia y la coincubación con las amibas se llevó a cabo a las 24 horas postsiembra, momento en el que la RET es máxima y permanece constante por cuando menos dos horas más.

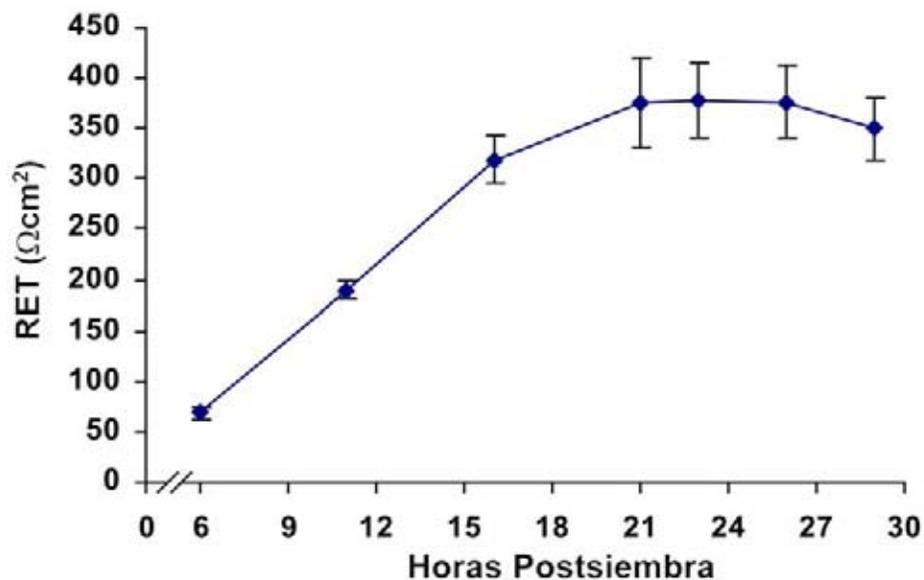


Fig. 2. Curso Temporal de la RET en Monocapas de Células MDCK (NBL2, In Vitro SA). Cada punto representa el promedio de cuatro determinaciones. La RET alcanza su valor máximo a las 21 horas, manteniéndose constante en éste hasta las 26 horas post siembra.

- b) Determinación de la proporción amiba:célula MDCK, así como del tiempo de coincubación óptimo para realizar las determinaciones de RET. Para llevar a cabo este estudio se sembraron 7 monocapas para cada

determinación con amibas, a una proporción de 1 trofozoito:5 células MDCK (cuadrados) y 1:10 (círculos). Los tiempos de coincubación fueron de 10, 20 y 30 minutos.

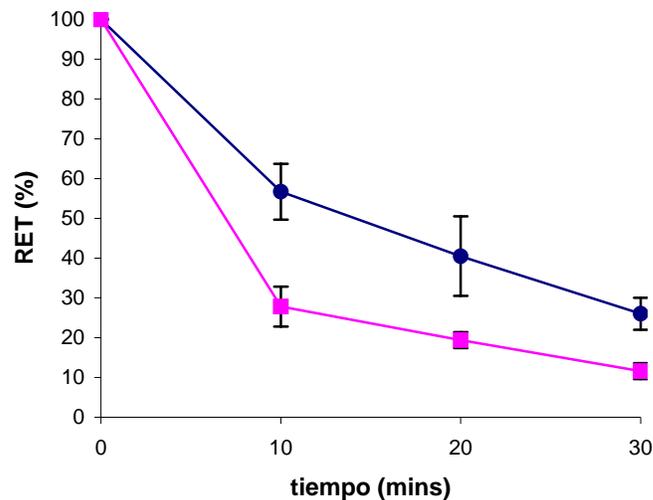


Fig. 3. Curso Temporal Corto de la RET de Monocapas de MDCK incubadas con 1:10 (círculos) o 1:5 (cuadrados) Amiba:Célula. Cada punto representa el promedio de al menos cinco monocapas. Las monocapas tenían 24 horas de sembradas al momento de la coincubación. La coincubación se llevó a cabo en medio TYI.

El daño producido por los trofozoitos a las monocapas de células MDCK en dos proporciones amiba:célula MDCK se determinó a diferentes tiempos midiendo la resistencia eléctrica transepitelial. Tal como se muestra en la Fig. 3, la RET disminuye considerablemente desde los cinco minutos de incubación con las amibas; el daño producido por éstas sobre la monocapa es máximo a los 30 minutos de coincubación cuando la proporción de amibas:célula MDCK es de 1:5.

De estos estudios preliminares se establecieron los parámetros empleados en los experimentos de coincubación de amibas (o lectina “pura”) con las monocapas. De manera que las monocapas que se utilizaron tenían entre 23-24 horas postsiembra, asegurándonos que en este tiempo la resistencia eléctrica

transepitelial era máxima y permanecería así durante al menos dos horas más. El tiempo de coincubación de las amibas con las monocapas sería 30 minutos y se eligió la proporción 1:5 trofozoito:células MDCK.

DETERMINACIONES DE OSMOLARIDAD

Las determinaciones de osmolaridad se llevaron a cabo con un medidor de conductividad Conductronic Mod. CL 8. La calibración del mismo se hizo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante: se preparó una solución estándar de NaCl, disolviendo 1 g de éste en 1 L de agua desionizada, la solución así constituida tiene una concentración de 17.4 mM que es equivalente a una resistencia de 1990 $\mu\text{ohms/cm}$. Se realizó una curva patrón con soluciones de diferente concentración de NaCl (0.1, 1.15, 0.2, 0.25 y 0.3 M), y osmolaridades desde 200 a 600 mosmol, determinando para cada una de ellas la lectura de resistencia en el aparato. Se hicieron las lecturas de resistencia para las soluciones de los diferentes azúcares en cuestión. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

ESTADÍSTICA

Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar. El significado estadístico entre los diferentes grupos experimentales con respecto al control se determinó por medio de la prueba de Tukey, t de Student o Dunnett. Una $P < 0.05$ se consideró como el límite para la significancia estadística. El análisis se llevó a cabo utilizando el programa Sigma Stat 2.0 Copyright© 1992-1995, Jandel Corporation (USA).

PURIFICACIÓN DE LA LECTINA GAL/NAcGAL.

La lectina es una glicoproteína que podría en teoría ser rastreada en las diferentes etapas durante el proceso de su purificación, aprovechando su capacidad

hemaglutinante, sin embargo, se trata también de una proteína integral de membrana, de la cual una parte (26 residuos aminoacídicos, fundamentalmente hidrofóbicos) está inmersa en la membrana plasmática del trofozoito y por ende, su purificación presume la utilización de detergentes, de manera que la hemaglutinación, cuando menos en las primeras etapas de su purificación, no era por sí sola, una técnica que nos permitiese discernir si la muestra en cuestión “hemaglutinaba” (por la presencia de lectina) o “lisaba” eritrocitos de sangre humana tipo “A” (por la presencia de detergente). Como una alternativa a la hemaglutinación, se pensó en la utilización de un anticuerpo monoclonal contra la lectina. El anticuerpo monoclonal que utilizamos fue el del kit comercial para diagnóstico *E. histolytica II* de TechLab Num. Cat. T5017 (118), que contiene el material necesario para efectuar ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), este anticuerpo tiene la ventaja adicional de que está acoplado a peroxidasa y no requiere de un anticuerpo secundario. En el capítulo de resultados se especifican las inmunotransferencias en las que se utilizó este anticuerpo.

1. PURIFICACIÓN DE LA LECTINA POR MICROELECTROELUCIÓN DESNATURALIZANTE

La muestra amibiana que se utilizó para la purificación mediante esta técnica consistió en un botón amibiano inhibido con Iodacetamida 50 mM y EDTA 10 mM en PBS-A, el cual fue congelado y descongelado 3 veces. La muestra así constituida se resuspendió en igual volumen de amortiguador desnaturalizante (para extraer proteínas de la membrana plasmática), y se hirvió en baño María durante 5 minutos. Esta muestra fue inyectada en un gel de poliacrilamida al 7.5%, se llevó a cabo una SDS PAGE (electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS) (119) y enseguida se desmontó el gel y se dispuso en el sistema microelectroelutor Mini Whole Gel Eluter de Bio Rad (Num Cat. 165-1256); la microelectroelución se efectuó con el mismo amortiguador de la electroforesis. Se utilizó un microcon con corte de peso molecular de 3,000 Da (Millipore 42404) para concentrar un volumen de 100 µl de cada una de las 14 fracciones

electroeluidas, el concentrado de cada una de ellas fue analizado por SDS PAGE, mediante tinción de plata (120) y por immunoblotting (inmunotransferencia).

2. PURIFICACIÓN DE LA LECTINA MEDIANTE MACROELECTROELUCIÓN DESNATURALIZANTE

La muestra amibiana utilizada para la purificación mediante esta técnica consistió en un botón amibiano tratado igual que el utilizado en la microelectroelución. A 1 ml de la muestra, con una concentración de 14 mg/ml se le agregó 1 ml de amortiguador desnaturalizante, y se calentó en baño María durante 5 minutos. Esta muestra fue inyectada en el sistema de macroelectroelución Prep Cell de Bio-Rad, modelo 491 (Num. Cat. 170-2927). El gel desnaturalizante se montó en el tubo de 37 mm. La macroelectroelución se llevó a cabo con la solución de corrida desnaturalizante a una potencia constante de 10 watts, con un flujo de elución de 0.75 ml/min. Se llevó a cabo el análisis de las fracciones electroeluidas (una cada 10 hasta la 140) mediante SDS PAGE 7.5%, los geles fueron teñidos con nitrato de plata. Habiendo determinado que las fracciones de interés (que contenían péptidos con pesos moleculares >150 y ≥ 260 kDa) se encontraban ~ entre la 20 y la 30, se hicieron geles (con igual concentración de acrilamida) en los que se analizaron cada una de las fracciones 17 a la 33 inclusive.

2.1. Secuenciación Aminoacídica e Identificación de la Fracción 23.

El Dr. Roberto Arreguín del Instituto de Química de la UNAM llevó a cabo la secuenciación de la muestra; brevemente: un volumen de 50 μ l de la fracción 23, con una concentración de 118 μ g/ml fue desglicosilada (Kit 80110 Glyko) y transferida a una membrana de PVDF para su secuenciación. La secuenciación N-terminal se llevó a cabo por el método convencional de degradación de Edman (121) en un secuenciador de proteína (Beckman LF 3000) equipado con un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con una columna de microesferogel PTH (Beckman de 2 mm x 150 mm).

La masa molecular de la proteína en la muestra fue determinada por espectrometría de masas en un espectrómetro “Esquire ion-trap” (Bruker-Flanzen Analytical, GmbH, Germany).

3. PURIFICACIÓN DE LA LECTINA MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE INMUNOAFINIDAD

Para llevar a cabo la purificación de la lectina por cromatografía de inmunoadfinidad, era necesario obtener anticuerpos específicos que más tarde se acoplarían a un soporte para constituir la columna. Una vez establecido que la fracción 23 (F_{23}) estaba constituida por la subunidad pesada de la lectina Gal/NAcGal se procedió a inmunizar un conejo con ésta y otro con la fracción anterior inmediata 22 (F_{22}); a estos conejos se les nombró: conejo₂₃ y conejo₂₂ (C_{23} y C_{22}).

3.1. Obtención de Anticuerpos Policlonales de Conejo contra Gal/NAcGal

3.1.1. Inmunización de los conejos

Las fracciones 22 y 23 obtenidas en la macroelectroelución (100 y 118 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) se utilizaron como antígenos para inmunizar un conejo con cada una de ellas; para ello, se mezcló un ml de la fracción con un ml de adyuvante incompleto de Freund (Gibco BRL Num. Cat. 15720-030), y ambos conejos macho Nueva Zelanda (de 2.5 kg de peso) fueron inyectados por vía intramuscular y subcutánea con 100 μg de proteína (suplementada con adyuvante) en dos ocasiones, con un lapso de tiempo de 15 días entre una y otra inmunización; 15 días después de la segunda, la inoculación fue intraperitoneal y no se utilizó adyuvante. Cinco días después de la tercera inmunización, se obtuvieron 5 ml de sangre de la oreja de cada conejo y ésta se almacenó a 4 °C durante toda la noche y tras centrifugación a 2,000 rpm se obtuvo el suero de cada conejo. La inmunoreactividad de cada uno de los sueros se probó mediante inmunodifusión en agar. En el pozo central de una caja pequeña de Petri se colocaron 50 μl de un

lisado total amibiano (un botón solubilizado en un amortiguador Tris 60 mM pH 6.8, conteniendo 2% SDS); en dos pozos adyacentes se colocaron 50 μ l de cada uno de los sueros de los conejos. La placa de agar se cubrió y se dejó difundir a temperatura ambiente durante 24 hrs. La positividad en la inmunodifusión nos condujo a sangrar a blanco ambos conejos mediante punción cardiaca de los animales anestesiados con éter, justo a los 7 días después de la tercera inmunización.

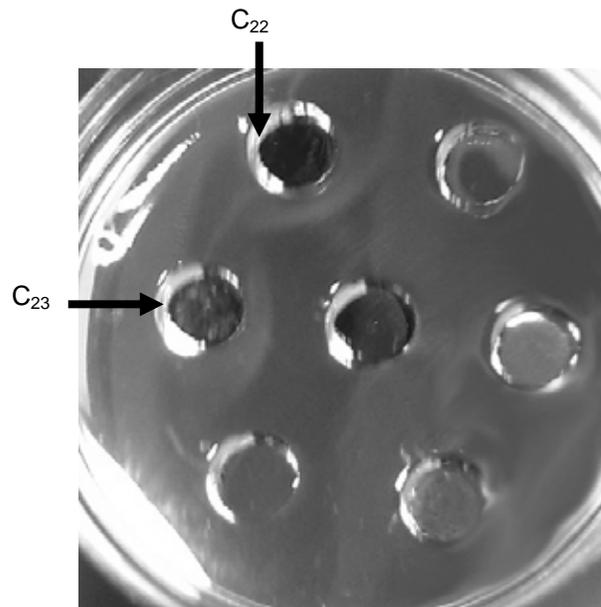


Fig. 4. Inmunodifusión en Agar de los Sueros de C₂₂ y C₂₃. El pozo del centro tenía una alícuota del lisado total amibiano, los pozos señalados como C₂₂ y C₂₃ tenían una alícuota del suero correspondiente.

3.1.2. Purificación de IgG's del suero de los conejos C₂₂ y C₂₃

El suero de cada conejo (~50 ml), en constante agitación fue precipitado lentamente con 25 ml de sulfato de amonio saturado a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C durante una noche. El suero precipitado se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 minutos, el botón obtenido (las gamaglobulinas) se resuspendió en 30 ml de amortiguador Tris 10 mM pH 7.4, se dializó en una bolsa de corte de peso molecular de 12,000-14,000 Da (Spectra/Por Num. Cat. 132 703) contra 5 L de amortiguador Tris 10 mM, pH 7.4, repitiendo esta operación dos veces más. Las gamaglobulinas fueron entonces sometidas a cromatografía de afinidad a través de una columna de sefarosa-proteína A (SIGMA Num. Cat. P-3391)

equilibrada con un amortiguador Tris 10 mM con NaCl 0.15 M. Se hicieron pasar por la columna alícuotas de 2 ml de la suspensión de gammaglobulinas; la proteína (fundamentalmente IgG) que se une a la proteína A se eluyó con 2 ml de Glicina 0.1 M pH 2.2 y fue rápidamente neutralizada con ~1.7 ml de Tris 1.5 M, pH 8.8, este proceso se realizó repetidas veces y el volumen total de las IgG's colectadas se dializó nuevamente contra Tris 0.1 M, NaCl 0.15 M pH 7.4 para finalmente ultraconcentrar en un Amicon de 50 ml con una membrana Diaflo YM-50 hasta una concentración de 1.5 mg/ml. Las IgG's puras provenientes de los conejos C₂₂ y C₂₃ se almacenaron en alícuotas de 1 ml a 0 °C hasta su uso.

3.2. Acoplamiento de IgG's del C₂₂ a un Soporte de Cromatografía: AFFI-GEL 10.

Se constituyó una columna de cromatografía de afinidad utilizando como soporte activado el Affi-Gel 10 Gel (BIO-RAD Num. Cat. 153-6046). Elegimos las IgG's C₂₂ para el acoplamiento, el cual se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente: 3 ml del soporte fueron activados químicamente con H₂O a 4 °C y enseguida se adicionó 56 mg de IgG's en buffer de acoplamiento (NaHCO₃ 0.1 M, pH 8.3); el acoplamiento se llevó a cabo con agitación moderada durante 5 hrs a 4 °C, al cabo del cual, las IgG's no acopladas se recuperaron mediante centrifugación a 500 rpm durante 3 minutos (la absorbancia a 280 nm nos permitió determinar que el 60% de la proteína se había unido al soporte) y la reacción se detuvo agregando un pequeño volumen de etanolamina 1 M. La columna de inmunoafinidad así constituida se equilibró con un amortiguador Tris 0.01 M, pH 7.4 y se almacenó a 4 °C en el mismo amortiguador adicionado de NaN₃ 5 mM hasta su uso.

3.3. Purificación de la Lectina Mediante Cromatografía de Inmunoafinidad.

Un botón amibiano constituido por 1.7×10^8 trofozoitos se llevó a un volumen final de 15 ml con una solución de Tris (0.05 M), pH 8.3, NaCl (0.15 M), Igepal (0.5%), suplementada con los siguientes inhibidores: Benzamidina (2 mM), p-hidroximercuribenzoato (PHMB) (2 mM), ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (5

mM), Aminoetil bencensulfonil fluoruro (AEBSF) (1 mM) y *trans*-Epoxisuccinil-L-leucilamido (4-guanidino) butano (E-64) (0.1 mM). La suspensión se congeló y descongeló tres veces para extraer las proteínas de membrana, enseguida se centrifugó a 10,000 g durante 30 minutos, se recuperó el sobrenadante y éste se recirculó a través de la columna de cromatografía de inmunoafinidad durante 48 horas en el cuarto frío, con una velocidad de flujo de ~0.1ml/min. Al cabo de este tiempo, la columna se lavó antes de su elución con un volumen de 100 ml del amortiguador inicial con el detergente y 100 ml más del mismo sin detergente, en ambos casos con una velocidad de 1ml/min. La columna se eluyó con ácido acético 0.2 N, colectando fracciones de 1 ml que eran neutralizadas con amortiguador Tris 1.5 M, pH 8.5. Las fracciones que eluyeron proteína se reunieron y dializaron (en bolsa de diálisis de corte de peso molecular de 12,000-14,000 Da) contra una solución de Tris 0.01 M, pH 7.4. La muestra se concentró hasta 1 ml en un centricon de corte de peso molecular de 100 kDa.

DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

En cualquier caso, la determinación de la concentración de proteína se hizo utilizando el método Micro BCA –Acido Bicinconínico- (Pierce Num. Cat. 23235), método que presenta la ventaja de ser compatible con la mayoría de los agentes surfactantes y además permite determinar concentraciones protéicas en un rango de 0.5-20 µg/ml.

ENSAYOS DE HEMAGLUTINACIÓN

Una característica que presentan las glicoproteínas que tienen actividad de lectina es precisamente su capacidad para hemaglutinar eritrocitos de una variedad de mamíferos; la lectina Gal/NAcGal, que como su nombre lo indica, reconoce específicamente a los azúcares galactosa y N-acetil-galactosamina, hemaglutina eritrocitos humanos de sangre tipo A. Para los ensayos de hemaglutinación se siguió la técnica referida por Petri y Schnaar (122); brevemente: se obtiene sangre

humana tipo A en tubos heparinizados, la sangre total se diluye en una proporción 1:1 en PBS, se desliza 4 ml de esta suspensión sobre 3 ml de Histopaque (Sigma Num. Cat. 10771) en un tubo de centrifuga, tras la centrifugación del gradiente a 400 g durante 25 minutos a 4 °C, los eritrocitos se recuperan y lavan dos veces con 10 ml de PBS centrifugando cada vez a 400 g durante 5 minutos a 4 °C. Los eritrocitos se cuentan en la cámara de Neubauer y el volumen se ajusta a una densidad de 2.4×10^9 células/ml en PBS para su almacenamiento hasta durante un mes a 0 °C. Para su utilización en los ensayos de hemaglutinación, la suspensión de eritrocitos contenía 2×10^7 células/ml en PBS suplementado de 2 mg/ml BSA (Albúmina Sérica Bovina), o bien se preparaba al 2% en PBS.

La hemaglutinación se llevó a cabo en multicámaras de 96 pozos con fondo en V. En ésta, cada hilera corresponde a diluciones seriales de una determinada muestra; en el primer pozo se pone la muestra concentrada, en el segundo una dilución 1:2, en el tercero una dilución 1:4, y así sucesivamente hasta la dilución 1:2048 que corresponde al doceavo y último pozo. Finalmente se agrega a cada pozo 50 µl de una suspensión de eritrocitos al 2%. Como control positivo siempre utilizamos la lectina *Vicia villosa* (Sigma Num. Cat. L 4011).

INMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN BLOTTING)

Las inmunotransferencias se llevaron a cabo siguiendo el método de Towbin *et al* (123), brevemente: justo al término de la electroforesis, el gel se desmontó para sumergirlo en amortiguador de transferencia, en el que permaneció durante unos cuantos minutos, enseguida se transfirió cuidadosamente sobre una membrana de PVDF (polyvinylidene fluoride) (Millipore Num. Cat. IPV 11 000 10) con un tamaño de poro de 45 µm que había sido previamente hidratada durante 5 minutos en metanol y otros 3 minutos en amortiguador de transferencia fresco. Flanqueando al gel y la membrana, se colocaron 2 papeles filtro (Whatman #3) que habían sido previamente hidratados con el mismo amortiguador, teniendo el cuidado de eliminar las burbujas de aire que se hubiesen formado entre algunas de sus capas. El “sandwich” se montó en la cámara de transferencia (BIO-RAD Num. Cat.

170-3935), el tanque se llenó con amortiguador de transferencia y la transferencia se llevó a cabo con una corriente constante de 400 mA, durante 2 horas en el cuarto frío. Al cabo de este tiempo, el “sandwich” se desmontó y la tira de la membrana correspondiente a los marcadores de peso molecular así como las tiras de la muestra transferida (siempre y cuando la concentración de ésta fuera $>1 \mu\text{g}$) se cortaron y se pusieron a teñir en solución de Coomassie. El resto de la membrana se bloqueó a temperatura ambiente con agitación suave, con una solución de leche descremada al 1.5 % durante 1.5 horas. En el caso de que la muestra a transferir tuviera una concentración $<1 \mu\text{g}$, se llevó a cabo la electroforesis simultánea de la misma muestra en dos geles con idénticas condiciones, al cabo de la electroforesis uno de los geles fue transferido mientras que el otro se fijó para su tinción con plata.

Una vez bloqueada la membrana con la muestra transferida, ésta se lavó tres veces con amortiguador Tris-salino-Tween (TBS-Tween), seguido de tres lavados con el mismo amortiguador sin detergente (TBS). Esta serie de lavados se repitió después de la incubación de la membrana con el anticuerpo primario y con el secundario. En todos los casos, la incubación con el anticuerpo primario se realizó a temperatura ambiente, durante toda la noche. El anticuerpo secundario que se utilizó fue de cabra anti-conejo peroxidado (BIO-RAD Num. Cat. 170-6515), diluido 1:2,000 y el tiempo de incubación con éste de dos horas a temperatura ambiente. Antes de revelar la membrana se hizo un lavado adicional a los referidos con Tris 0.1 M pH 7.4. Se reveló con Diamino benzidina (DAB). En ocasiones, cuando el anticuerpo primario era un policlonal, éste fue incubado durante 1 hora con polvo de hígado de hámster con agitación a temperatura ambiente, al cabo de este tiempo, se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos, para recuperar el sobrenadante

Las diluciones de todos los sueros o anticuerpos se hicieron en amortiguador Tris 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.4.

MEDIOS Y SOLUCIONES.

1) Para Cultivo Amibiano.

La composición del medio TYI-S-33 y el PBS-A se da en las tablas I y II.

2) Para Cultivo de MDCK.

La composición del DMEM y el PBS utilizado en el cultivo de las células de la línea MDCK se presenta en las tablas III y IV

3) Para Electroforesis y Electroelución.

Las soluciones empleadas en estas técnicas se describen a continuación:

- a) *Amortiguador Muestra Desnaturalizante*: Tris 0.06 M pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 0.005% azul de bromofenol.
- b) *Amortiguador de Corrida Desnaturalizante*: Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, 0.1% SDS. A esta solución no se le ajusta el pH.
- c) *Solución de Teñido con Coomassie*: 0.25% azul brillante de Coomassie R250, 10% ácido acético en metanol:H₂O (1:1 v/v). Esta solución se filtra a través de un papel Whatman del No.1
- d) *Solución de Desteñido*: esta solución es idéntica a c) excepto porque no lleva el colorante.
- e) *Solución Fijadora para Tinción de Plata*: 30% etanol, 10% ácido acético glacial.
- f) *Solución de Teñido de Plata*: esta solución se prepara a partir de una solución madre de nitrato de plata al 20% filtrada, la dilución que se utiliza es 0.1%.
- g) *Solución de Revelado*: 2.5% carbonato de sodio, 0.02% formaldehído.

4) Para Inmunotransferencia.

- a) *Amortiguador de transferencia*: 20% metanol, Tris 0.025 M, glicina 0.19 M.
- b) *TBS-Tween*: Tris 0.01 M pH 7.0, NaCl 0.15 M, 0.0125% Tween 80.
- c) *TBS*: esta solución es idéntica a b) excepto porque no lleva detergente.

d) *Amortiguador de dilución del suero o anticuerpo*: Tris 0.1 M pH 7.0, NaCl 0.15 M.

e) *Solución de Revelado de Acción de Peroxidasa*: 0.08% DAB, 2% H₂O₂, Tris 0.1 M pH 7.0.

REACTIVOS.

Reactivos Varios

- *Adyuvante Incompleto de Freund GIBCO 0307
- *AEBSF (4-[2-aminoetil] bencensulfonil fluoruro) SIGMA A8456
- *Benzamidina [Hidrocloruro de Bencencarboximidamida] SIGMA B6506
- *Bepiridil [hidrocloruro de 1-Isobutoxi-2-pirrolidino-3-[N-bencil-anilino]propano] SIGMA B5016
- *DAB (Diamino bencidina) (3,3'-Diaminobencidina, Tetrahydrocloruro) SIGMA D5637
- *E-64 [*trans*-Epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino) butano] SIGMA E3132
- *EDTA (Acido etilendiamino, sal tetrasódica dihidratada) SIGMA ED4SS
- *Galactosa [D-(+)-Galactosa] SIGMA G0625
- *Glucosa [D-Glucosa anhidra] JT BAKER 1916-01
- *Inhibidor de Rosenthal [Acetato de dimetil-DL-2,3-diestearoil-oxipropil-2'-hidroxietil-amonio] CALBIOCHEM 321488
- *Lactosa [D-Lactosa] [β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-D-Glc, monohidrato]
- *Manosa [D-Manosa] SIGMA M6020
- *N-Acetil Galactosamina [2-Acetamido-2-desoxi-D-galactosa] SIGMA A2795
- *NP 40 (Nonidet P 40, Igepal) [(Octilfenoxi)polietoxietanol] SIGMA I3021
- *Paraformaldehído [p-Formaldehído] SIGMA P6148
- *PHMB [Sal sódica de p-hidroximercuribenzoato] SIGMA H0642
- *Tris (Trizma base) (2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol) SIGMA T1503
- *Verapamil [hidrocloruro de (\pm) verapamil] SIGMA V4629
- *Yodacetamida [Iodoacetamida] SIGMA I6125

Reactivos para Electroforesis y Blotting

- *Acrilamida BIO-RAD 161-0107
- *Bis acrilamida [Bis N,N' metilen-bis-acrilamida] BIO-RAD 161-0201
- *Glicina BIO-RAD 161-0718
- *Persulfato de amonio BIO-RAD 161-0700
- *TEMED [N, N, N',N'-Tetrametilendiamina] BIO-RAD 161-0801

Reactivos para Cultivo Celular

- *Antibac (Penicilina 100 U/ml, Estreptomina 100 µg/ml) MICROLAB MC 110
- *Insulina (Insulina humana, de origen recombinante) LILLY HI 210
- *Suero bovino adulto MICROLAB SU 140
- *Suero bovino enriquecido con Hierro GIBCO 1037-029
- *Tripsina MICROLAB D 8410

TABLA I

Componente	TYI-S-33 gms/l
Biosate	30
Dextrosa	10
K ₂ HPO ₄	1.0
KH ₂ PO ₄	0.6
NaCl	2.0
Cisteína	1.0
Acido Ascórbico	0.2
FAC (Citrato de amonio férrico)	0.0225

El CTYI-S-33 es el TYI suplementado de 10% Suero Bovino y 3% mezcla multivitamínica de Diamond

TABLA II

COMPONENTE	SOLUCION SALINA DE FOSFATOS pH 7.2 PARA AMIBAS (PBS-A) ml/l	CONCENTRACION FINAL M
HPO ₄ Na ₂ /H ₂ PO ₄ Na pH 7.2 0.15 M	100	0.015
NaCl 0.205 M	900	0.19

TABLA III

COMPONENTE	MEDIO DE EAGLE CON SALES DE DULBECCO (DMEM) GIBCO 31600-034 mg/l
SALES INORGANICAS:	
CaCl ₂	200
KCl	400
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	0.1
MgSO ₄ (anhidro)	97.67
NaCl	6400
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	125
OTROS COMPONENTES:	
Glucosa	1000
Rojo de Fenol	15
Piruvato de Sodio	110
AMINOACIDOS:	
L-Arginina•HCL	84
L-Cisteína•2HCl	62.57
L-Glutamina	584
Glicina	30
L-Histidina HCl•H ₂ O	42
L-Isoleucina	105
L-Leucina	105
L-Lisina•HCl	146
L-Metionina	30
L-Fenilalanina	66
L-Serina	42
L-Treonina	95
L-Triptofano	16
L-Tirosina (sal disódica)	104.2
L-Valina	94
VITAMINAS:	
D-Ca Pantotenato	4
Cloruro de Colina	4
Acido Fólico	4
i-Inositol	7.2
Nicotinamida	4
Piridoxal•HCl	4
Riiboflavina	0.4
Tiamina•HCl	4

TABLA IV

COMPONENTE	AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS (PBS) GIBCO 21300-025 gms/l
KCl	0.2
KH ₂ PO ₄	0.2
MgCl ₂	0.047
NaCl	8
NaHPO ₄	1.15

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

PRIMERA PARTE.....	47
1. ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD DE LAS AMIBAS	
TRATADAS CON DIFERENTES INHIBIDORES.....	47
1.1. Aspecto Normal de la Monocapa de Células MDCK.....	47
1.2. Efecto de Diferentes Inhibidores en la Disminución	
de la RET Producida por E. histolytica.....	48
1.3. Análisis Microscópico de las Monocapas Tratadas	
con los Trofozoitos Inhibidos.....	50
1.4. Efecto sobre la RET de Trofozoitos Pretratados	
con Diferentes Dosis de Galactosa.....	51
1.5. Determinación de la Especificidad de la Galactosa en el	
Efecto Observado.....	52
DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE ESTA PRIMERA PARTE.....	54
CONCLUSIONES.....	56
SEGUNDA PARTE.....	56
1. PURIFICACIÓN DE LA LECTINA Gal/NAcGal MEDIANTE	
ELECTROELUCIÓN.....	56
1.1. Purificación Utilizando el Sistema Microelectroelutor.....	57
1.2. Purificación Utilizando el Sistema Macroelectroelutor.....	59
1.2.1. Secuenciación de la fracción 23.....	61
2. PURIFICACIÓN DE LA LECTINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA	
DE INMUNOAFINIDAD.....	63
2.1. Inmunización de los Conejos.....	63
2.2. Preparación de una Columna de Cromatografía de	
Inmunoafinidad con las IgG's de C₂₂.....	66

2.3. Purificación de la Lectina Mediante Cromatografía de Inmunofinidad.....	67
3. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS A ENSAYAR EN NUESTRO SISTEMA. ALGUNAS CONSIDERACIONES.....	69
a) <i>Muestra Resultante de la Microelectroelución.....</i>	69
b) <i>Muestras Provenientes de Macroelectroelución.....</i>	71
c) <i>Muestra Obtenida por Cromatografía de Inmunofinidad.....</i>	72
4. EFECTO DE LAS DIFERENTES MUESTRAS DE LECTINA PURIFICADAS EN LA APERTURA DE LAS UNIONES ESTRECHAS DE LAS CÉLULAS MDCK EN MONOCAPA.....	75
CONCLUSIONES.....	77
OTROS ESTUDIOS RELACIONADOS.....	81
1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA LECTINA Gal/NAcGal EN LAS AMIBAS VIRULENTAS Y NO VIRULENTAS DE LA CEPA HM1:IMSS.....	81
2. EFECTO DE LAS AMIBAS HM1:IMSS CULTIVADAS EN PRESENCIA DE E-64 SOBRE LA MONOCAPA DE CÉLULAS MDCK.....	87

PRIMERA PARTE

1. ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD DE LAS AMIBAS TRATADAS CON DIFERENTES INHIBIDORES

1.1. Aspecto Normal de la Monocapa de Células MDCK

La monocapa de la línea celular MDCK representa un sistema ideal para determinar en forma cuantitativa el daño producido por los trofozoitos mediante la resistencia eléctrica transepitelial (RET) (95, 98). La RET de la monocapa refleja la integridad de la misma, la que a su vez depende de que las células estén en contacto unas con otras, sellando el espacio intercelular mediante las uniones estrechas. La Fig. 5 muestra claramente que no hay espacios intercelulares libres.

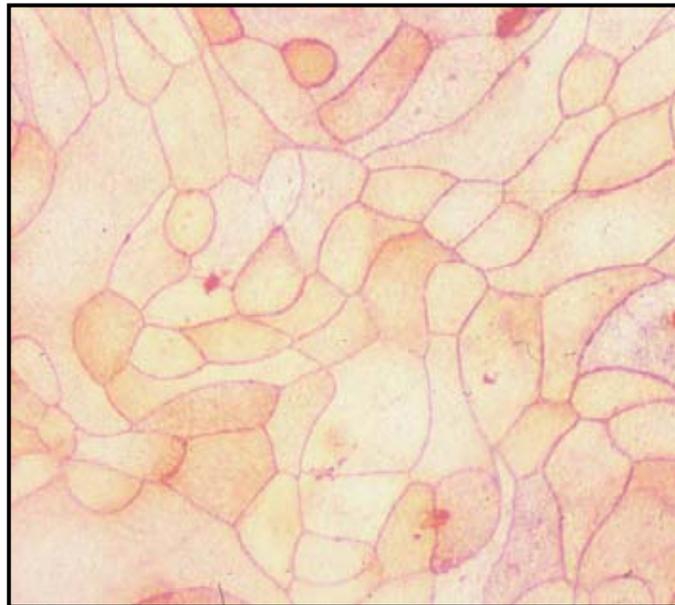


Fig. 5. Fotomicrografía de una Monocapa de Células MDCK a las 24 hrs Después de Sembrada a Confluencia. El cemento intercelular teñido con plata destaca que no hay espacios intercelulares libres, las células se encuentran estrechamente unidas unas a otras. Contratinción de hematoxilina.

1.2. Efecto de Diferentes Inhibidores en la Disminución de la RET Producida por *E. histolytica*

La tabla 1 muestra los valores de RET en $\text{ohms}\cdot\text{cm}^2$ de monocapas de células MDCK que fueron coincubadas con trofozoitos tratados con diferentes inhibidores.

	a-2 MACRO GLOBULINA (3mg/ml)	E 64 (10 ⁻⁴ M)	INHIBIDOR DE ROSENTHAL (10 ⁻³ M)	VERAPAMILO (10 ⁻⁴ M)	BEPRIDIL (10 ⁻⁵ M)	GALACTOSA (180 mM)	TODOS MENOS GALACTOSA
MONOCAPA MDCK (n=8)	743 ± 79 100%	318 ± 21 100%	1030 ± 40 100%	373 ± 73 100%	413 ± 73 100%	826 ± 90 100%	578.8 ± 80 100%
MONOCAPA MDCK HM1-IMSS (n=8)	10 ± 5 1%	40 ± 101 13%	213 ± 21 20%	41 ± 3 11%	16 ± 3 4%	12 ± 3 2%	23.67 ± 4 4.1%
MONOCAPA MDCK HM1-IMSS + INHIBIDOR (n=8)	90 ± 21 12%	45 ± 11 14%	170 ± 29 17%	159 ± 15 43%	51 ± 10 12%	991 ± 47 100%	11.16 ± 23 20%

Tabla 1. Efecto de Diferentes Inhibidores en la Disminución de la RET Producida por *E. histolytica*. Valores de la RET de monocapas MDCK control, a los 30 minutos de coincubación con HM1:IMSS, o con HM1:IMSS pretratadas con el inhibidor en cuestión. Los valores de RET se expresan tanto en $\text{ohms}\cdot\text{cm}^2$, como en porcentaje con respecto al valor de la monocapa control.

Como ya se había mencionado en la introducción de este trabajo, la intención de estos experimentos fue inhibir (de manera específica en algunos casos) las moléculas que se creía eran determinantes en el daño producido por la amiba en las células de la monocapa. A la fecha, no se cuenta con un inhibidor del amiboporo. En el momento en que se diseñaron estos experimentos se disponía de un dato en la literatura: el tratamiento de amibas de la cepa HM1:IMSS con Verapamil o Bepridil (dos bloqueadores de canales lentos de $\text{Na}^+\text{-Ca}^{++}$, que aunque tienen el mismo efecto neto, no comparten el mecanismo de acción), prevenía la muerte de células CHO inducida por las amibas (59); decidimos pues ensayar el efecto de estos inhibidores de canales en nuestro sistema. Por otra

parte, para inhibir la potente batería de enzimas de la amiba, de las cuales, las proteasas de cisteína constituyen el grupo más prominente (124), utilizamos dos inhibidores de proteasas: la α -2-macroglobulina (presente en plasma humano), que inhibe proteasas sin bloquear la actividad estereolítica de la enzima, y el E-64, que es un inhibidor específico de proteasas de cisteína y actúa de manera irreversible. La actividad de fosfolipasa A amibiana se inhibió con el inhibidor de Rosenthal (125), y, por último, la lectina Gal/NAcGal se inhibió con galactosa.

Para cada grupo se tomó como control (asignado como 100%) el valor de resistencia de la monocapa incubada durante 30 minutos con medio CTYI + el inhibidor en cuestión. Aunque la caída de la resistencia provocada por las amibas no fué siempre la misma, los valores de RET a los 30 minutos de coincubación con trofozoitos HM1:IMSS resultó ser drástica ($\leq 20\%$). Los resultados se expresan como promedio (de cuando menos 8 determinaciones) \pm el error estándar. En la Fig. 6 se plasmaron los valores porcentuales de la tabla anterior en forma de histograma, para facilitar su análisis.

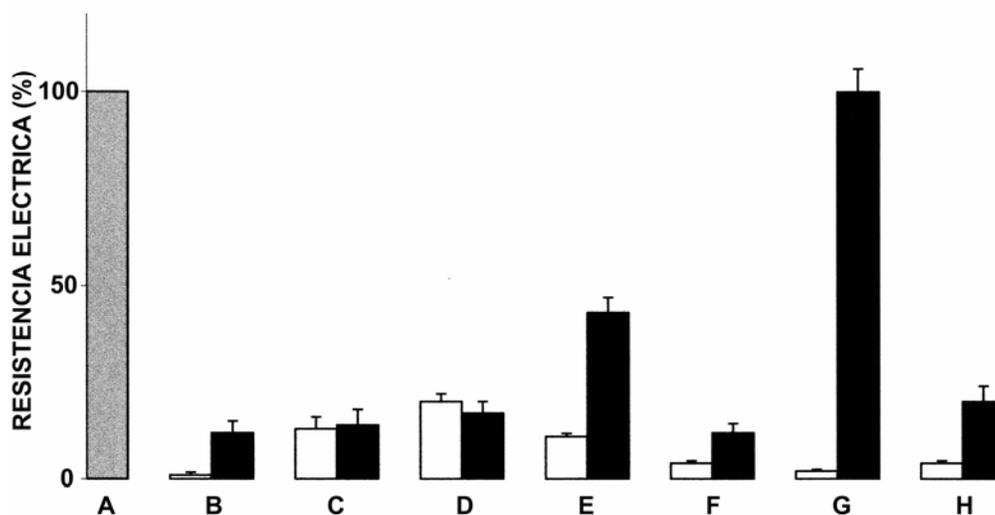


Fig. 6. Efecto de Diferentes Inhibidores en la Disminución de la RET Producida por *E. histolytica*. Barras blancas: monocapas incubadas con trofozoitos. Barras negras: monocapas incubadas con trofozoitos pretratados con el inhibidor. A: monocapas control; B: α -2-macroglobulina; C: E-64; D: inhibidor de Rosenthal; E: Verapamil; F: Bepridil; G: galactosa; H: todos los inhibidores excepto galactosa

De los diferentes inhibidores de los factores de virulencia utilizados, el único que bloqueó por completo la disminución de la RET de la monocapa fue la galactosa. El tratamiento con Verapamilo inhibió en un 30% la disminución en la resistencia de la monocapa. La incubación de los trofozoitos con una mezcla de todos los inhibidores excepto galactosa previno la disminución de la RET en un 20%.

1.3. Análisis Microscópico de las Monocapas Tratadas con los Trofozoitos Inhibidos

El efecto de los trofozoitos inhibidos sobre las monocapas fue analizado de manera paralela mediante microscopía óptica teniendo monocapas desarrolladas sobre un soporte no permeable. La figura 7 muestra las micrográficas de las monocapas de MDCK.

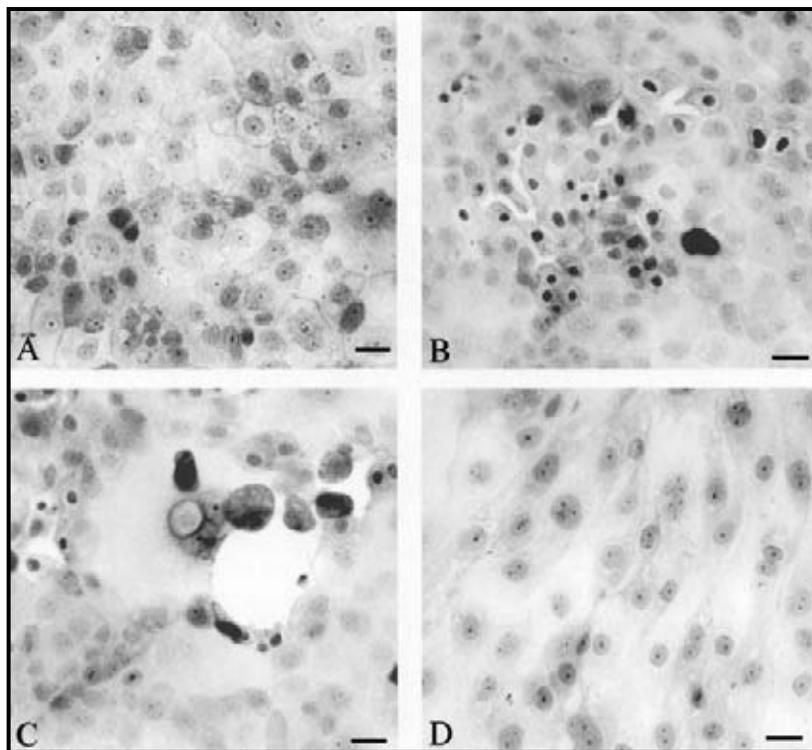


Fig. 7. Aspecto Microscópico de Monocapas de Células MDCK. Las monocapas fueron fijadas a los 30 minutos de su incubación con: **A** medio CTYI, **B** trofozoitos en CTYI (en una proporción de 1:10 amiba:célula), **C** trofozoitos en CTYI (en una proporción de 1:5 amiba:célula), y **D** trofozoitos en CTYI/Galactosa 180mM, en el que habían sido incubados durante 1 hora previa su coincubación con la monocapa.

La monocapa control muestra las células de origen epitelial fuertemente unidas unas a otras, sin dejar espacios visibles entre ellas. Después de 30 minutos de coincubación con los trofozoitos se observan pequeñas hendiduras o grandes hoyos separándolas (dependiendo de la proporción de amiba:célula MDCK), por lo general en la vecindad de las amibas. También en la vecindad de las amibas, en células aún adheridas al soporte, se destaca una morfología nuclear anómala. La Fig. 7 también muestra que la monocapa coincubada con los trofozoitos pretratados con Galactosa 180 mM es prácticamente indistinguible de la monocapa control, no sólo porque carece de espacios intercelulares, sino también por la ausencia de amibas, las cuales no se adhieren a la monocapa.

1.4 Efecto sobre la RET de Trofozoitos Pretratados con Diferentes Dosis de Galactosa.

Para determinar si el efecto inhibitorio de la galactosa se observa con dosis inferiores a 180 mM, incubamos los trofozoitos con diferentes concentraciones de

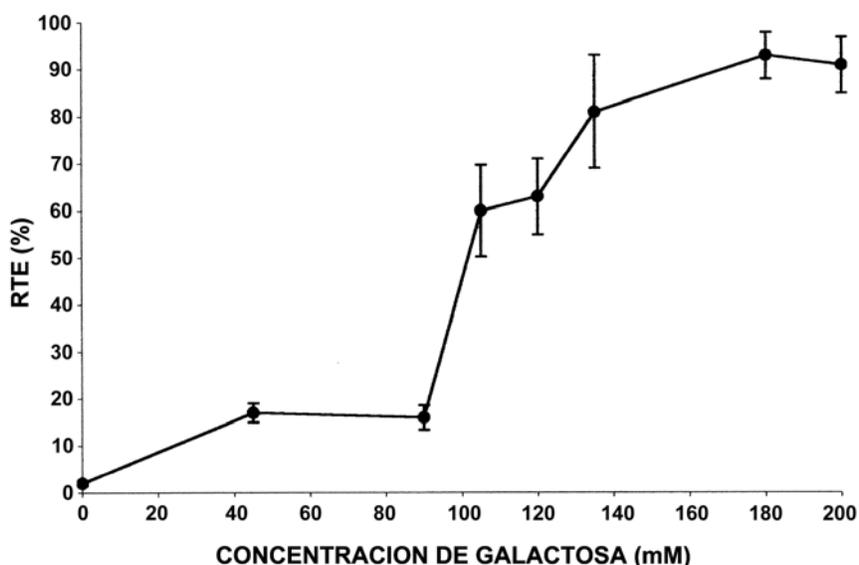


Fig. 8. Efecto de Diferentes Concentraciones de Galactosa. Se midió la RET de monocapas de células MDCK que habían sido coincubadas durante 30 minutos con trofozoitos pretratados por una hora con diferentes concentraciones de galactosa. La proporción amiba:célula fue 1:5. Cada punto representa el promedio de al menos siete determinaciones.

galactosa y determinamos la RET de las monocapas coincubadas con éstos. La Fig. 8 muestra que el efecto inhibitor de la galactosa es dosis dependiente, siendo la concentración óptima 180 mM, ya que con esta concentración se inhibe por completo la caída de la RET, y también para un número fijo de trofozoitos representa el punto de saturación, pues por arriba de esta concentración no se incrementa el efecto.

1.5. Determinación de la Especificidad de la Galactosa en el Efecto Observado

Para determinar si el efecto inhibitorio de la galactosa en la disminución de la RET inducida por los trofozoitos era un efecto específico, se ensayaron otros dos monosacáridos: glucosa y manosa y el disacárido lactosa. Para ello, tratamos durante 1 hora a los trofozoitos en CTYI suplementado con 180 mM del azúcar en cuestión, los coincubamos con monocapas de MDCK y determinamos la RET de éstas a los 30 minutos de coincubación. Por otra parte, medimos la osmolaridad de cada uno de estos medios

MEDIO	OSMOLARIDAD (mOsm)			mOsm
MEDIO TYI	351	351	332	345
MEDIO TYI+GALACTOSA 180mM	547	542	564	551
MEDIO TYI+GLUCOSA 180mM	540	567	564	557
MEDIO TYI +MANOSA 180mM	-	542	565	554
MEDIO TYI+LACTOSA 180mM	506	554	554	538

Tabla 2. Valores de Osmolaridad del CTYI Suplementado con Diferentes Azúcares. Para cada medio se realizaron determinaciones de osmolaridad en tres diferentes osmómetros. La última columna representa el promedio.

Como podemos ver en la tabla 2 la osmolaridad fue la misma para los medios suplementados con los diferentes azúcares, oscilando entre 538 y 557 mosm. Sin

embargo, no todos los azúcares tuvieron el mismo efecto en los trofozoitos; la figura 9 muestra los valores porcentuales de RET de monocapas de MDCK a los 30 minutos de su coincubación con trofozoitos pretratados con lactosa, glucosa y manosa, así como con el respectivo control para cada grupo de los trofozoitos en condiciones normales con CTYI y con CTYI-galactosa.

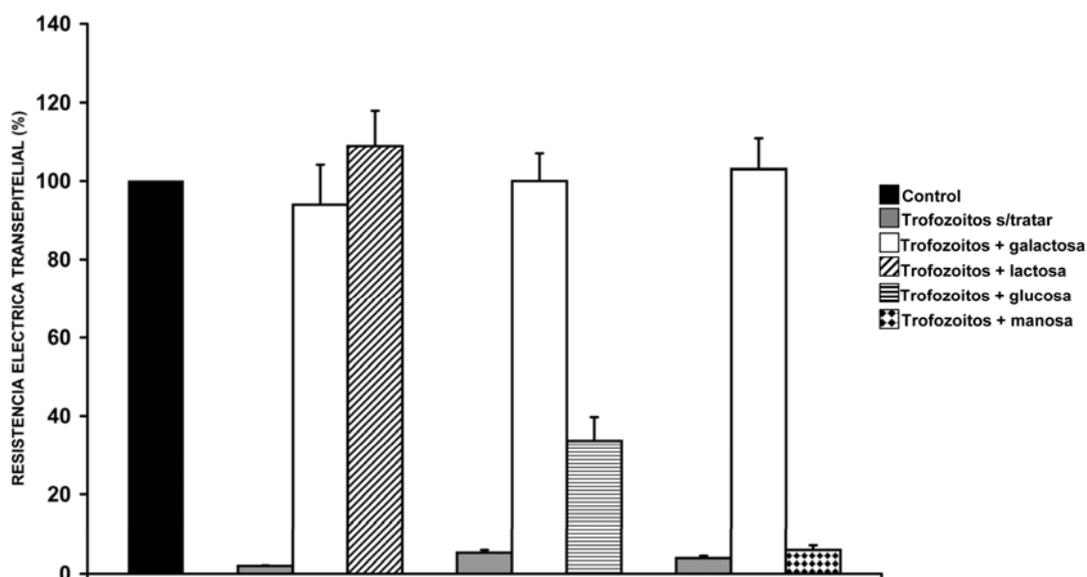


Fig. 9. Efecto de Diferentes Azúcares en la Disminución de la RET Producida por *E. histolytica*. Para cada grupo de experimentos se indica el valor de la RET de monocapas a los 30 minutos de coincubación con trofozoitos pretratados con CTYI+galactosa o CTYI+el azúcar en cuestión. En todos los casos la proporción amiba:célula fue 1:5.

De los azúcares ensayados, sólo la lactosa, que es un disacárido (constituído por una molécula de galactosa y otra de glucosa) inhibió totalmente la disminución de la RET, mientras que la glucosa inhibió ~ 25% y la manosa no tuvo ningún efecto. Esto confirma que el efecto inhibitor de la galactosa es específico y descarta la posibilidad de que la inhibición observada se deba a un problema de osmolaridad.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE ESTA PRIMERA PARTE

De los inhibidores que probamos, solamente el verapamilo y la galactosa tuvieron un efecto significativo en la disminución de la RET de la monocapa de MDCK provocada por los trofozoitos amibianos; de ellos, sólo la galactosa inhibió por completo la caída de la RET.

Es un hecho bien establecido que la adhesión es un paso necesario para muchos de los ensayos *in vitro* de la virulencia amibiana (22, 126). Se han descrito varias adhesinas diferentes (127, 128, 138), aunque la lectina inhibible por galactosa parece ser responsable no sólo de la mayor parte de la adherencia, sino también de parte de la citotoxicidad, quizás no directamente de la citotoxicidad letal, pero cuando menos como un mediador de alguna señal que active un mecanismo específico (83). En nuestros estudios, la inhibición de la adhesión amibiana por la galactosa también bloqueó la citotoxicidad.

En un estudio realizado por Ravdin *et al* (59), la citopatogenicidad de *E. histolytica* sobre células CHO fue inhibida tanto por el verapamilo como por el bepridil, sin embargo, estos investigadores atribuyeron el efecto del verapamilo a su acción sobre las células blanco más que sobre la amiba. En nuestro experimentos no podemos descartar que éste haya sido el caso, ya que el inhibidor estuvo presente en el medio durante los 30 minutos de coincubación con la monocapa; en cualquier caso lo que es un hecho es que el efecto inhibidor del verapamilo no lo produjo el bepridil (el otro antagonista de canales de calcio que probamos). Al respecto, es interesante mencionar que se ha demostrado que el verapamilo reduce la capacidad infiltrante y quimiotáctica de linfocitos en endotelio vascular humano (130), y estudios realizados *in vitro* han revelado que este fármaco tiene un efecto inhibitorio en la adhesión plaquetaria, así como en la actividad invasiva de algunas líneas celulares metastásicas (130). Probablemente, aunque por un mecanismo aún no definido, el verapamilo haya inhibido la adhesión amibiana.

De los monosacáridos que se probaron, la D-glucosa y la D-manosa, el primero epímero de la D-galactosa con respecto a C(4), y el segundo estereoisómero de la D-galactosa con respecto a C(2) y C(4), ninguno inhibió la disminución de la RET

inducida por los trofozoitos amibianos. Puesto que ambos difieren en la disposición espacial del C(4) con respecto a la D-galactosa, podríamos especular que la disposición de C(4) en la galactosa sea determinante para la interacción de la lectina amibiana con su correspondiente ligando en la superficie de las células MDCK. Por otra parte, la lactosa, un disacárido constituido por una D-galactosa y una D-glucosa (β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-D-Glc), resultó inhibir la disminución de la RET al igual que la galactosa. Este resultado coincidió con los informados en varios estudios previos (81, 83, 84), aunque contrasta con los de Ellen Li y colaboradores (129), quienes llevaron a cabo un estudio utilizando monocapas de células Caco-2 (provenientes de intestino humano) y encontraron que la lactosa no inhibió la disminución de la RET causada por la coincubación con trofozoitos amibianos. Aunque en dicho estudio se utilizó una menor proporción amiba:célula, una menor concentración de lactosa y menor tiempo de tratamiento con el azúcar, lo cual podría dar cuenta del diferente resultado con respecto a nuestro estudio, existe también la posibilidad de que se deba al hecho de que se utilizaron diferentes tipos de células epiteliales.

La citotoxicidad amibiana debe ser un proceso multifactorial, que requiere de la adhesión de las amibas a la célula blanco para la participación del resto de las moléculas involucradas en el daño celular, pero, entonces, al menos algún incremento en el grado de inhibición de la disminución de la RET se debería de haber observado en nuestros experimentos cuando se permitió la adherencia entre las células MDCK de la monocapa y las amibas que habían sido tratadas previamente con los otros inhibidores (excepto la galactosa). En vez de esto, este efecto parece reflejar sólo aquél observado con el verapamilo.

No hemos descartado directamente el posible papel del amiboporo en el daño ejercido por los trofozoitos sobre la monocapa de células de origen epitelial.

De esta primera parte del trabajo obtuvimos las siguientes conclusiones:

CONCLUSIONES

La amiba produce un daño temprano (30 minutos) en una monocapa de la línea celular MDCK que puede cuantificarse en términos de la resistencia eléctrica transepitelial de ésta. Este daño temprano no es atribuible a proteasas, específicamente de cisteína, y tampoco a fosfolipasas. El daño en la monocapa resulta de la adherencia amibiana vía la lectina Gal/NAcGal per se o bien ésta es una molécula sine qua non se produce el daño.

Por lo anterior, para poder determinar si la lectina por sí sola abate la RET o si es la primer molécula implicada en una serie de sucesos que conducen a dicho abatimiento, llevamos a cabo la purificación de la lectina Gal/NAcGal de la amiba, para finalmente probarla en nuestro sistema experimental, lo cual constituye la segunda y última parte de esta tesis.

SEGUNDA PARTE

A diferencia de la primera parte de este capítulo, en que llevamos a cabo la discusión al final de los resultados, en esta segunda parte los discutiremos a la par, con fines de mayor claridad.

1 .PURIFICACIÓN DE LA LECTINA Gal/NAcGal MEDIANTE ELECTROELUCIÓN

Para la electroelución, tanto con el sistema Mini Whole Gel Eluter, como con el sistema Prep Cell la muestra inicial se preparó a partir de un botón amibiano inhibido con Iodacetamida 50 mM y EDTA 10 mM, congelado y descongelado, solubilizado con el amortiguador desnaturalizante, y calentado en baño María durante 5 minutos. En la figura 10 se muestran los resultados de la transferencia de una SDS PAGE al 7.5% de acrilamida de la muestra amibiana preparada como acabamos de describir; se distingue una banda muy ténue en la tira teñida con

Coomassie con peso molecular de 260 kDa, misma que es reconocida por el anticuerpo comercial contra la lectina. De manera que estábamos seguros de que en la muestra amibiana a electroeluir, se encontraba la proteína de nuestro interés.

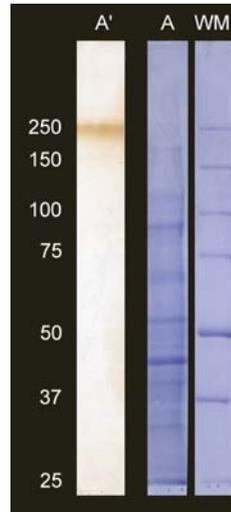


Fig. 10. Transferencia de la Muestra Amibiana a Electroeluir. Se transfirió un gel al 7.5% tras la SDS PAGE de la muestra amibiana. La muestra consistió en un botón ($\sim 5 \times 10^6$ trofozoitos) inhibido con IA y EDTA, solubilizado con SDS y calentado. Por carril se montaron 120 μ g de proteína. WM: marcadores de peso molecular, A: tira de la muestra teñida con Coomassie, A': tira de la muestra tratada con anticuerpo monoclonal comercial antilectina acoplado a peroxidasa y revelada con DAB.

1.1. Purificación utilizando el sistema microelectroelutor

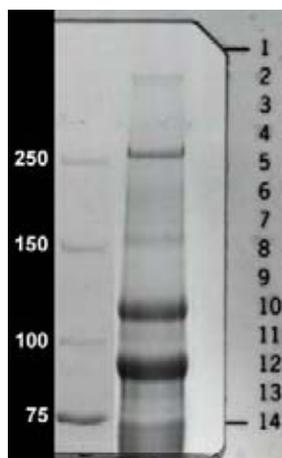


Fig. 11. Gel al 5% de la Muestra Amibiana a Electroeluir. Patrón protéico de la muestra tras SDS PAGE. Los números de la derecha (en negro) indican la correspondencia entre el gel y el número de fracción a microelectroeluir.

Para realizar la electroelución en el Mini Whole Gel Eluter es necesario llevar a cabo primero la electroforesis de la muestra, para después electroeluir del gel los diferentes componentes de la misma, de manera simultánea. Puesto que la lectina tiene un peso molecular elevado, se preparó el gel al 5%, con lo cual, además de facilitar la elución al tener la malla más abierta, una serie de péptidos de bajo peso molecular quedarían descartados en el extremo inferior del gel (ver figura 11). Se montaron 130 μg de proteína/carril de la muestra (preparada como se describió en la sección anterior) en ocho carriles; la electroelución desnaturante se llevó a cabo a 8 °C. Se colectaron 14 fracciones de $\sim 150 \mu\text{l}$ cada una, éstas se analizaron en SDS PAGE al 7.5% y los geles se tiñeron con plata. En la figura 12 se muestra el análisis electroforético de estas fracciones. Se observa que en las fracciones 6 y 7 aparecen bandas con pesos moleculares en un rango ≥ 250 y ≥ 150 kDa, que serían las de nuestro interés. Pensando que una de esas fracciones correspondía a la lectina, llevamos a cabo una transferencia, ésta fue tratada con el anticuerpo monoclonal comercial y revelada con DAB; sin embargo, el resultado fué negativo.

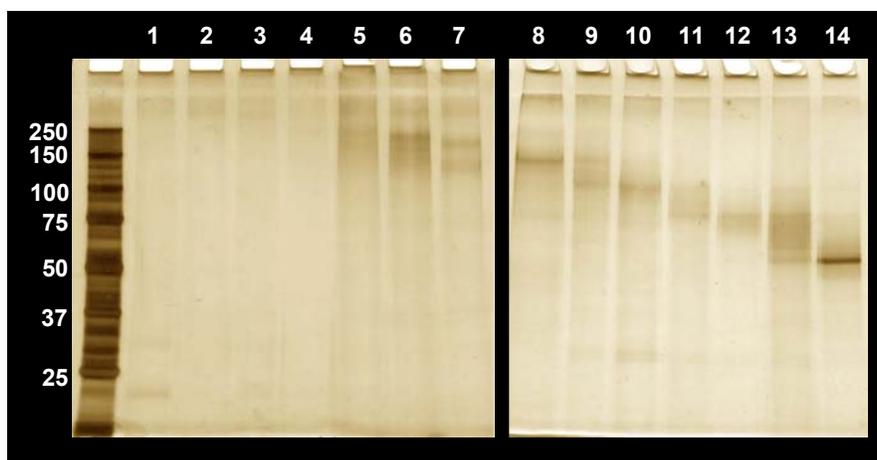


Fig. 12. Análisis Mediante SDS PAGE 10% de las Fracciones Obtenidas por Microelectroelución. Geles teñidos con plata de las 14 fracciones colectadas de la microelectroelución de una muestra amibiana inhibida con IA y EDTA. Las condiciones de la electroelución fueron desnaturantes, y la concentración de acrilamida en el gel, de 5%.

Una probable explicación al resultado negativo del reconocimiento del anticuerpo a alguna de las fracciones obtenidas en la microelectroelución, sería que, durante la misma, la lectina hubiese sufrido alteraciones en su conformación espacial y, por ello el anticuerpo no la haya reconocido. El anticuerpo comercial es un anticuerpo monoclonal, y puede ser que reconozca un epítoto conformacional. Si bien este método no resultó ser conveniente para purificar una cantidad considerable de lectina, sí nos fue de utilidad para diseñar las condiciones óptimas para realizar la electroelución con el sistema PREP CELL.

1.2.Purificación Utilizando el Sistema Macroelectroelutor

En el sistema PREP CELL, la electroelución se lleva a cabo de manera simultánea a la electroforesis; aún cuando la experiencia previa de la microelectroelución nos permitió elegir las condiciones óptimas (tales como concentración y naturaleza del gel, buffer de elución, temperatura) para ésta, no se sabía en qué fracciones se colectaría la lectina, de manera que se dejó correr la electroforesis y justo al

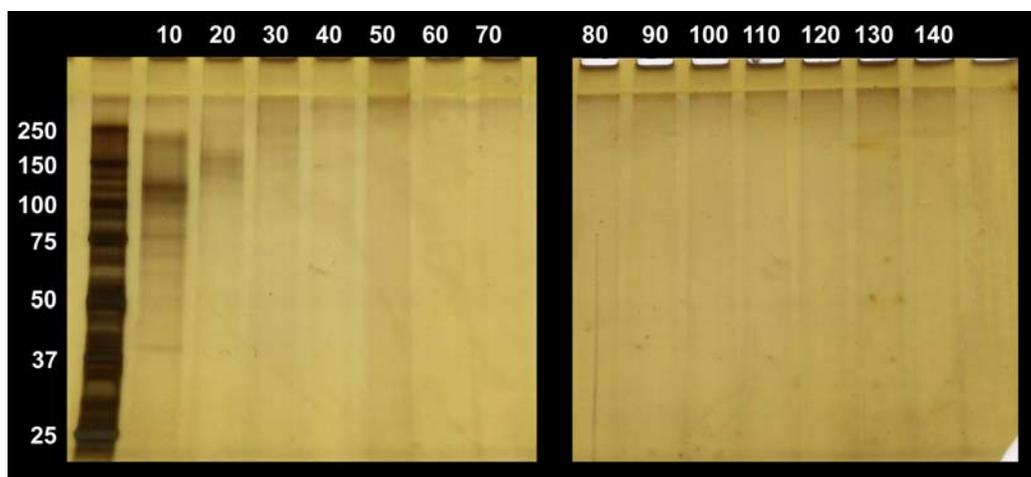


Fig. 13. Análisis Mediante SDS PAGE 7.5% de las Fracciones Obtenidas por Macroelectroelución. Se analizaron las fracciones 10-140 obtenidas por macroelectroelución utilizando el sistema de PREP CELL. Tinción de plata.

terminar de salir el colorante del frente de avance, se empezó a numerar las fracciones. Al momento en que se habían colectado 140 fracciones (de 6 ml cada una), se hizo un análisis mediante SDS PAGE al 7.5% de una fracción cada diez.

El resultado se muestra en la figura 13. Como puede observarse, en la fracción 10 hay numerosas bandas con pesos moleculares <250 kDa; sin embargo, en la fracción 20 se ve claramente una sola banda con un peso molecular ligeramente

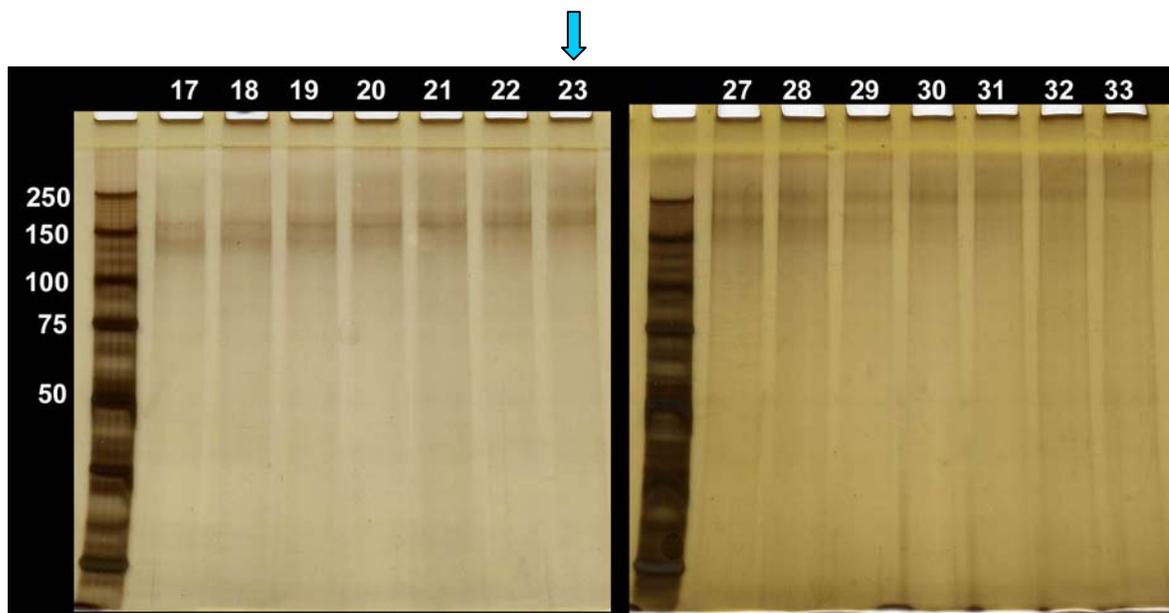


Fig. 14. Análisis Electroforético de las Fracciones 17-23 y 27-33 Obtenidas en la Macroelectroelución. Geles al 7.5% teñidos con plata en los que se analizó mediante SDS PAGE las fracciones 17 a 23 y 27-33 obtenidas de la macroelectroelución en PREP CELL de una muestra ambiente tratada con IA y EDTA.

por arriba del marcador de 150 kDa y en la fracción 30 una banda con un peso molecular aproximado de 260 kDa; por lo que se decidió analizar de una en una las fracciones en torno a la 20 y a la 30. En la figura 14, se muestran los geles, teñidos con plata de las fracciones 17-23 (izquierda), y 27-33 (derecha). Como puede observarse, los pesos moleculares de las bandas correspondientes a cada fracción se encuentran en un rango entre los 150 y 250 kDa, y, cuando menos en base al peso molecular, alguna(s) podría(n) corresponder a la lectina. Nuevamente, se llevó a cabo un Western blot de estas fracciones y se trató con el anticuerpo monoclonal comercial, y de nuevo éste no reconoció ninguna de las fracciones. No obstante, elegimos para su secuenciación a la fracción 23 (indicada con una flecha), debido a que en esta fracción destaca una banda nítida, con un

peso molecular de aproximadamente 170 kDa y otra borrosa, con un peso aproximado de 260 kDa.

1.2.1. Secuenciación de la fracción 23

La secuenciación de la fracción 23, así como el análisis por espectrometría de masas la llevó a cabo el Dr. Roberto Arreguín. Para ello, la muestra fué desglucosilada como se indica en el capítulo II de esta tesis. El resultado indicó que la fracción 23 estaba constituida por dos péptidos: el más abundante, que denotaremos como H, tuvo un peso molecular de 142,584 Da y se secuenciaron sus 12 residuos amino terminal; el otro péptido de la muestra, al que llamaremos L, presente en menor proporción, tuvo un peso molecular de 63,324 Da, del cual se secuenciaron 8 residuos amino terminal. Las secuencias resultantes de los dos componentes fueron:

PEPTIDO	ABUNDANCIA	SECUENCIA	PESO MOLECULAR
Péptido H	+++	MKLLLLNILLLC	142,583.7 Da
Péptido L	++	MILLVLLI	63,323.6 Da

La búsqueda en el BLASTP de las secuencias de proteínas de *E. Histolytica* HM1:IMSS con empalme significativo para la secuencia de la proteína H indicó la existencia de dos péptidos con una homología del 100%:

- [ref|XP_656181.1|](#) subunidad pesada de la lectina Gal/NAcGal MKLLLLNILLLC coincidencia del 100%.
- [ref|XP_655415.1|](#) subunidad de 170 kDa de la lectina inhibible por galactosa MKLLLLNILLLC coincidencia del 100%.

Por otra parte, en la literatura se encuentra notificado el peso molecular de dicha subunidad, calculado a partir de la constitución aminoacídica, como de 143 kDa (131), el cual coincide con el peso molecular determinado por espectroscopía de masas. Estos resultados nos indicaron que, indiscutiblemente, la fracción 23

estaba constituida fundamentalmente por la cadena pesada (de 170 kDa) de Gal/NAcGal de *E. histolytica* HM1:IMSS.

De igual forma, se buscó en el BLASTP las secuencias de proteínas de *E. histolytica* HM1:IMSS con empalme significativo para la secuencia de la proteína L; el resultado indicó que los péptidos con mayor homología respecto a los 8 residuos amino terminal de nuestra secuencia, eran:

- ref|XP_655472.1| proteína hipotética 28.t00041 de *E. Histolytica*.
MILLILLI coincidencia del 87%.

- ref|XP_656145.1| péptido precursor de la subunidad de 35 KDa de la lectina inhibible por galactosa.
MILLVLLI coincidencia del 87%.

En cualquier caso, se trata de secuencias que tienen solo una sustitución con respecto a nuestra secuencia: en el primer caso la valina ha sido sustituida por una isoleucina, en el otro, una leucina de nuestra secuencia ha sido sustituida por una isoleucina; sin embargo, se trata de aminoácidos conservados y por eso no se considera una diferencia relevante.

Los dos péptidos que constituyen la fracción 23 (las dos bandas que aparecen en el gel de la figura 14) tienen pesos de: 260 y 170 kDa; es lógico que el análisis de esta fracción haya indicado que el componente más abundante en la misma sea la subunidad de 170, porque ésta se encuentra en la muestra como monómero, pero también en su forma heterodimérica, la cual, durante el tratamiento para la secuenciación se desdobra y da lugar a la subunidad de 170 y a la que parece ser la proteína precursora de la subunidad ligera.

Dos de los genes que codifican la subunidad ligera de la lectina (*Igl 1 y 2*) fueron secuenciados por Tannich y cols (132) y McCoy y cols (72); se estimó la masa molecular de las dos proteínas a partir de los genes clonados y ésta fué de 32 kDa; sin embargo, nuestros resultados parecen indicar que la molécula precursora de la subunidad de 35 kDa, con un peso molecular de 63 kDa, se encuentra

asociada a la subunidad pesada. Lo que en definitiva llama la atención es el hecho de que tanto el monómero de 170 como el heterodímero de 260 kDa hayan electroeluido conjuntamente, lo cual parece sugerir que ambas estructuras se encuentran asociadas en la membrana.

2. PURIFICACIÓN DE LA LECTINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD

Con la seguridad de que la fracción 23 (F_{23}) correspondía a la lectina Gal/NAcGal y habiendo montado las condiciones para purificar más de esta molécula mediante la técnica de macroelectroelución, decidimos destinar dicha fracción y la inmediata inferior, la 22 (F_{22}), para inmunizar con cada una un conejo.

2.1. Inmunización de los Conejos

La concentración de cada una de las fracciones, determinada mediante el método de BCA fue: 118 $\mu\text{g/ml}$ (fracción 23) y 100 $\mu\text{g/ml}$ (fracción 22). Siguiendo el esquema de inmunización descrito en el Capítulo II de esta tesis, se utilizaron ambas fracciones para inmunizar dos conejos. Se obtuvieron sueros inmunopositivos (determinado por inmunodifusión) de ambos conejos, los cuales se nombraron C_{22} y C_{23} dependiendo de la fracción con la cual fueron inmunizados.

Para determinar la especificidad de ambos sueros, se llevaron a cabo transferencias de un lisado de un botón amibiano tratado con IA 50 mM y EDTA 10 mM, así como de las fracciones 22 y 23; estas transferencias fueron tratadas con una dilución 1:200 de cada uno de los sueros de los conejos C_{22} y C_{23} y con un anticuerpo secundario obtenido en chivo anticonejo acoplado a peroxidasa. Puesto que el suero del C_{22} dio un título mayor, la figura 15 muestra el resultado del revelado con DAB de las transferencias tratadas con el suero C_{22} .

En la figura 15, en la transferencia de la izquierda, que corresponde al total de

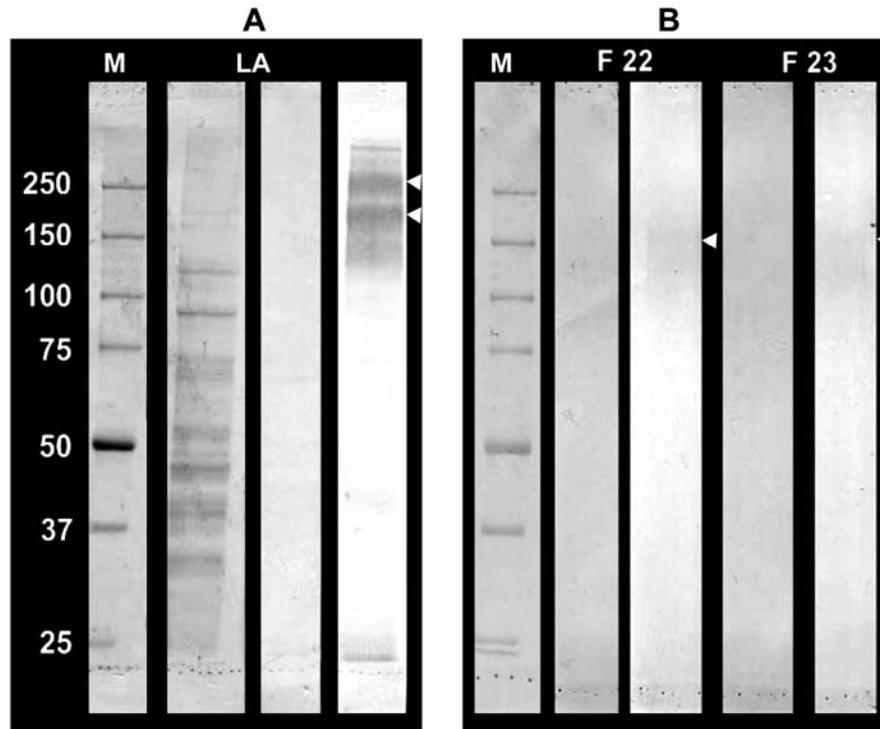


Fig. 15. Western Blot de un Lisado Total Amibiano y de las Fracciones F₂₂ y F₂₃ Puras. Se llevaron a cabo dos transferencias: **A:** un lisado total amibiano (LA) y **B:**Fracciones 22 y 23 puras (F₂₂.y F₂₃). En cada transferencia se muestran teñidos en Coomassie los marcadores de peso molecular. En A la muestra aparece también teñida en Coomassie; no se muestran tiras de las fracciones puras teñidas con Coomassie debido a que se cargó una cantidad de éstas visible sólo en tinción de plata. La tira de la izquierda de cada pareja corresponde al suero preinmune, mientras que la de la derecha al suero hiperinmune del conejo 22. La dilución que se utilizó fué 1:200.

proteínas amibianas presentes en el lisado (tira teñida con Coomassie), el suero del conejo 22 preinmune no reconoció ningún péptido, mientras que el hiperinmune reconoce dos péptidos con pesos moleculares mayores a 260 kDa, los cuales pudieran corresponder a agregados de la lectina (69); la banda que corresponde a la lectina con un peso molecular de 260 kDa (apenas perceptible en la tira teñida con Coomassie), otra banda que tiene un peso molecular de 170 kDa, y una banda gruesa que corresponde a varios péptidos en la cercanía del marcador de peso molecular de 150 kDa, que probablemente sean productos de degradación de la subunidad pesada, o bien correspondan a la misma en proceso de glicosilación postraduccional. Si bien Cheng y colaboradores consideraron originalmente la posibilidad de que la subunidad pesada de la lectina tuviera un

epítoto común con la subunidad intermedia (de 150 kDa) (75), la secuencia aminoacídica de ésta última descartó esa posibilidad y confirmó la íntima asociación de ambas (77), lo cual explicaría, en parte, el hecho de que en diferentes preparaciones la subunidad intermedia copurifique con Gal/NAcGal, así como que la subunidad pesada copurifique con la intermedia (76). Finalmente, nuestro anticuerpo reconoce una banda justo al final del gel, por debajo del marcador de 25 kDa; la cual parece corresponder a péptidos de degradación. Por otra parte, en la transferencia de la derecha, que corresponde a las fracciones 22 y 23, vemos de nuevo que el suero preinmune no las reconoce, mientras que el hiperinmune sí. Puesto que el suero C₂₂ reconoce tanto a la fracción 22 (utilizada como antígeno en ese conejo), como a la 23, podemos concluir que ambas fracciones están constituídas por el mismo péptido.

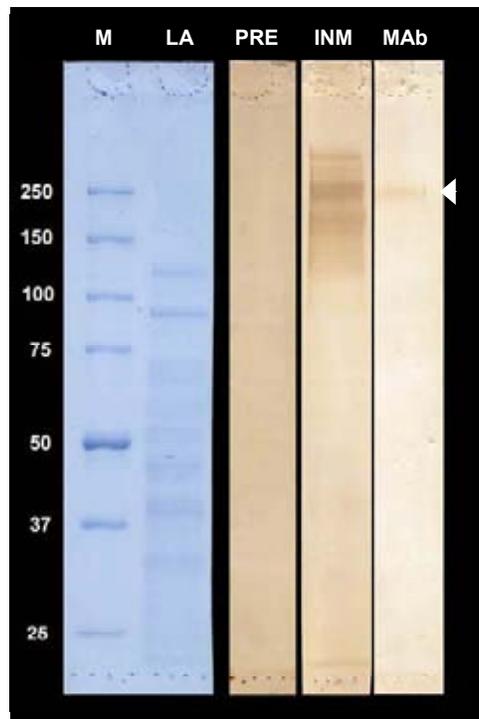


Fig. 16. Transferencia de un Lisado Amibiano con el Suero F₂₂ y Anticuerpo Monoclonal Comercial. Se llevó a cabo una SDS PAGE al 7.5% de un lisado total amibiano preparado de igual manera que en la transferencia anterior. Se muestran de izquierda a derecha: Marcadores de peso molecular, muestra teñida con Coomassie, tira tratada con suero C₂₂ preinmune (diluído 1:200), tira tratada con suero C₂₂ hiperinmune (diluído 1:200) y tira tratada con anticuerpo monoclonal comercial (diluído 1:50). Las dos tiras de suero C₂₂ fueron incubadas con un anticuerpo de chivo anti conejo peroxidado (dilución 1:2000) y todas reveladas con DAB.

Con la finalidad de constatar que el anticuerpo monoclonal comercial reconocía lo mismo que los anticuerpos policlonales del C₂₂, transferimos nuevamente muestra del lisado amibiano utilizado en la transferencia anterior. El resultado de esta transferencia se muestra en la figura 16. El anticuerpo monoclonal reconoce la misma banda de 260 kDa que reconoce el policlonal del C₂₂, mismo que, por ser policlonal, reconoce varias bandas.

De los experimentos relativos a la producción de anticuerpos contra la lectina Gal/NAcGal, podemos concluir lo siguiente: tanto la fracción 22 como la 23 resultaron ser inmunogénicas en conejos. Ambos sueros (del C₂₂ y del C₂₃) fueron específicos para el péptido más abundante en la fracción utilizada como inmunógeno (subunidad pesada de la lectina), por ello, reconocen las diferentes formas de la lectina en las que se encuentra esta subunidad: la forma heterodimérica (de 260 kDa), agregaciones de la misma (las bandas de pesos mayores a 260) y a la misma subunidad de 170 kDa, presentes en el lisado amibiano. También se puede concluir que la conformación de la lectina se modifica tras la electroelución, ya que el anticuerpo monoclonal la reconoce antes de utilizar dicha técnica, en el lisado amibiano, pero no después, en las fracciones obtenidas de la electroelución. Contrario al monoclonal, posiblemente los epítopes que reconocen los anticuerpos de C₂₂ y C₂₃ sean secuenciales, puesto que reconocen a la lectina antes y después de llevar a cabo la electroelución.

2.2. Preparación de una Columna de Cromatografía de Inmunofinidad con las IgG's de C₂₂

Las gamaglobulinas de los sueros C₂₂ y C₂₃ fueron obtenidas por precipitación con sulfato de amonio y las IgG's por cromatografía de Sefarosa-Proteína A. Las IgG's del C₂₂ así purificadas, fueron acopladas a un soporte Affi Gel 10, siguiendo las instrucciones del fabricante, con una eficiencia de acoplamiento del 60%. La columna de cromatografía de inmunofinidad se equilibró con un amortiguador Tris 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 8.3 y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

2.3. Purificación de la Lectina Mediante Cromatografía de Inmunoafinidad

Después de recircular la muestra amibiana durante 48 horas a través de la columna de cromatografía de inmunoafinidad y habiendo lavado la misma, de manera exhaustiva, se llevó a cabo la elución de lo retenido específicamente en la columna. Para su análisis mediante SDS PAGE la muestra se trató con los siguientes inhibidores: EDTA 10 mM, IA 50 mM y E-64 100 μ M.

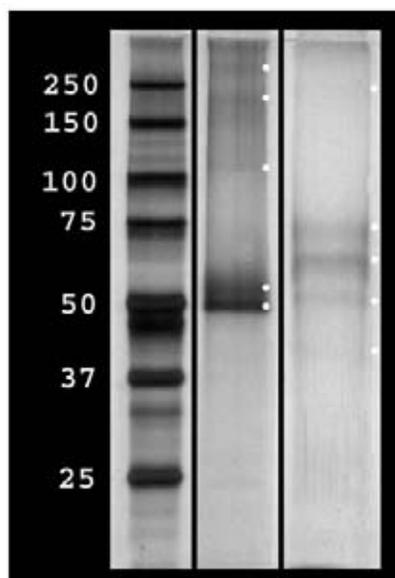


Fig. 17. Análisis Electroforético de la Muestra Obtenida por Cromatografía de Inmunoafinidad. SDS PAGE al 7.5%, tinción de plata. La muestra fué tratada con inhibidores: EDTA 10 mM, IA 50 mM y E-64 100 μ M. En el carril central: muestra en condiciones normales, carril extrema derecha: muestra reducida con β mercaptoetanol.

En la figura 17 se muestra el resultado de este análisis. El gel, teñido en plata indica que la muestra sin reducir (carril central), está conformada por cuando menos 5 componentes: una banda con peso molecular por arriba del marcador de 250 kDa, un doblete con pesos aproximados de 200 y 170 kDa, seguido de una banda de 110 kDa y la banda más prominente de todas, con un peso molecular cercano a 50 kDa; este patrón cambia por completo si la misma muestra se reduce con β -mercaptoetanol (carril extrema derecha), observándose una banda muy tenue con un peso cercano a 250, tres bandas bien definidas, con pesos moleculares calculados: de 75, 68 y 53 kDa, y otra poco definida entre 50 y 37 kDa.

No sabemos por qué el tratamiento de la muestra con β -mercaptoetanol, que, supuestamente debería dar lugar a la aparición de las bandas de 170, 31 y/o 35, no tiene este efecto sino que reduce el número de bandas y modifica el patrón de las mismas con respecto a la muestra no reducida. Es posible que el β -mercaptoetanol active a alguna proteasa presente en la muestra y ésta actúe sobre algunos componentes de la misma. Sin embargo, llama la atención que otro grupo de investigación, Carrero y colaboradores (139), observaron que al purificar la lectina Gal/NAcGal (a partir del medio de cultivo de *E. Histolytica* HM1:IMSS) mediante cromatografía de afinidad de galactosa, la muestra obtenida analizada en condiciones reductoras indicaba la aparición de una banda con peso molecular de 68 kDa, ausente en la muestra no reducida; lo anterior hace pensar que ésta es una proteína asociada de manera específica a la lectina amibiana, que no depende del origen de la muestra inicial (sea sobrenadante de cultivo o botón amibiano), ni del tipo de cromatografía utilizada en la purificación (sea cromatografía de afinidad de galactosa o de inmovinoafinidad). Durante varios años traté de purificar la lectina mediante cromatografía de afinidad de galactosa. El análisis electroforético de las muestras entonces obtenidas, mediante tinción de plata, invariablemente mostraba otras bandas además de la de 260 kDa que W. A. Petri y cols describieron cuando purificaron y caracterizaron la lectina como una molécula de 260 kDa (69, 122).

La muestra obtenida mediante cromatografía de inmovinoafinidad fue transferida a papel de nitrocelulosa y sometida a tratamiento con anticuerpos C₂₂ (ver figura 20). La tinción de plata corroboró que dicha muestra estaba constituida por diferentes proteínas, además de la lectina. Dichas proteínas muy probablemente se encuentren asociadas a la lectina, puesto que el anticuerpo policlonal de conejo que acoplamos al soporte, de todas las proteínas amibianas, solamente reconoce a la lectina (y sus derivados). Al analizar por SDS PAGE la muestra en ausencia de inhibidores, ésta aparecía completamente degradada, por lo que se infiere que al menos un componente de la muestra tiene actividad enzimática. Si bien el hallazgo de que la lectina copurificaba con la proteína intermedia (purificada por Tachibana y cols en el año de 1998) fue la base para proponer que ésta no era

una entidad aislada en su funcionamiento, no fué sino hasta el año 2002, en que Petri, W. A. y cols en una excelente revisión sobre las interacciones lectina-carbohidrato (76) hicieron referencia, por vez primera, a que la lectina “pura” consiste en un complejo de proteínas. Me permito citar textualmente una parte del manuscrito:

“...Analysis of two-dimensional gels of affinity-purified Gal/GalNAc lectin show a complex pattern of proteins, which suggests that the lectin serves as a nucleation site for a number of different proteins potentially involved and required for interaction with the host...”

Más tarde, M. Hughes y cols. (133) identificaron una proteína antioxidante tiol-específica “asociada al complejo de lectina GalNAc” y en el 2005, J. McCoy y B. Mann (134) describieron una serie de proteínas “asociadas a la lectina GalNAc”, entre las cuales refieren proteínas de citoesqueleto como la actina y algunas enzimas como la CP2.

3. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS A ENSAYAR EN NUESTRO SISTEMA. ALGUNAS CONSIDERACIONES

a) Muestra Resultante de la Microelectroelución

La purificación mediante esta técnica se efectuó en varias ocasiones. Si bien el patrón electroforético era muy similar en cada electroelución (compárese la figura 12 con la 18), nunca fue idéntico como para poder reunir las fracciones de diferentes microelectroeluciones; no obstante, quisimos determinar qué fracción(es) correspondía(n) a la lectina Gal/NAcGal. Teniendo ya la seguridad de

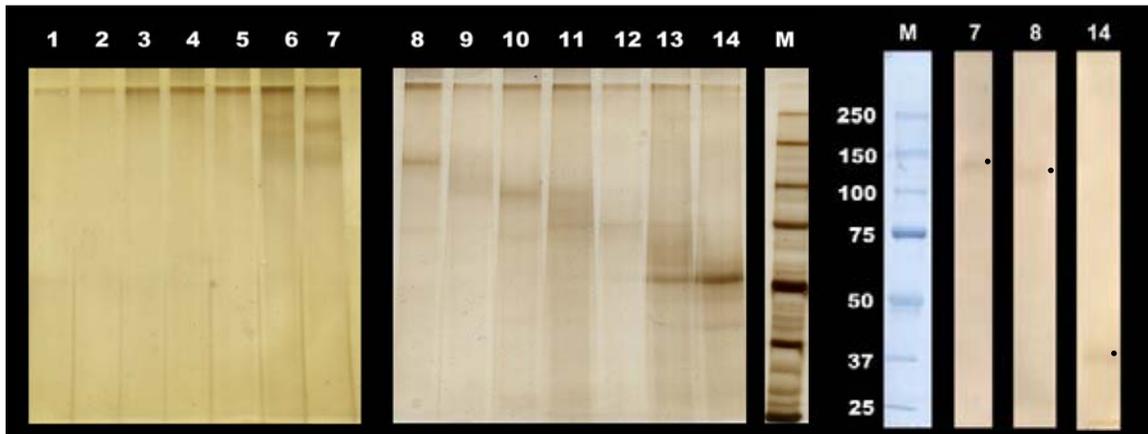


Fig. 18. SDS PAGE y Western Blot de Fracciones Obtenidas en una Microelectroelución. Tinción de plata de 2 geles al 7.5% donde se analizan por carril cada una de las 14 fracciones obtenidas mediante microelectroelución en condiciones desnaturalizantes. Esas mismas fracciones fueron transferidas a pvdf, se trataron con una dilución 1:500 del suero C₂₂, y un anticuerpo secundario peroxidado y finalmente se reveló con DAB. Se muestran las tiras correspondientes a las fracciones 7, 8 y 14, que fueron reconocidas por el anticuerpo.

que contábamos con un anticuerpo policlonal de conejo específico para la lectina Gal/NAcGal ambiana, decidimos llevar a cabo un western blot de las fracciones obtenidas por microelectroelución; recordemos que el anticuerpo monoclonal comercial no había reconocido ninguna de las fracciones obtenidas utilizando esta técnica. La figura 18 muestra las 14 fracciones obtenidas en una microelectroelución, las cuales fueron transferidas y tratadas con nuestro anticuerpo policlonal C₂₂, un secundario peroxidado y reveladas con DAB; en el extremo derecho de la figura se muestra el western blot de las fracciones transferidas que fueron reconocidas. Como puede observarse, el anticuerpo policlonal C₂₂ reconoce péptidos con pesos moleculares aproximados de: 130, 125 y 37 kDa, en las fracciones 7, 8 y 14 respectivamente; de los que los dos primeros son, a juzgar por sus pesos moleculares, productos de degradación de la lectina, o bien precursores no glicosilados de la misma. Llama la atención el hecho de que de los tres péptidos presentes en la fracción 14, los anticuerpos del C₂₂ reconocen aquél de peso molecular de ~37 kDa. Si bien éste podría ser un producto de

degradación de la subunidad pesada de 170 kDa, también podría corresponder a la subunidad ligera de la lectina, lo que implicaría que el suero del conejo 22 reconoce a ambas subunidades, lo cual es factible, ya que la fracción que se utilizó como antígeno fue la inmediata inferior a la que se mandó secuenciar, que como se mencionó en el apartado **1.2.1.**, estaba constituida por un péptido precursor de la cadena ligera. Aún cuando la subunidad ligera ha sido ampliamente estudiada, y existen anticuerpos monoclonales contra ella, se desconoce su función específica en el complejo. Sería muy útil que nuestro anticuerpo policlonal de conejo tuviera, además de la especificidad por la cadena pesada, especificidad por dicha subunidad ligera.

Las fracciones obtenidas por microelectroelución no se utilizaron en los ensayos finales con las células MDCK, porque en cada microelectroelución se obtenía muy poca cantidad de cada fracción y ésta no era suficiente para realizar todo un grupo de experimentos.

b) Muestras Provenientes de Macroelectroelución.

La macroelectroelución de otra muestra amibiana demostró que la técnica es muy reproducible. En la figura 19 A se muestra en plata el análisis electroforético de las fracciones 21 a 29 obtenidas por macroelectroelución de otra muestra amibiana tratada de la misma forma que en el apartado **1.2.** De estas fracciones, seleccionamos la 21, rica en un péptido con un peso molecular de 170 kDa, y la 24, constituida por un doblete de bandas de 170 y ~150 kDa y otro péptido con un peso de 260. En la figura 19 B se muestra la positividad de estas dos fracciones con el anticuerpo C₂₂, el cual reconoció las bandas de 150 y 170 kDa, aunque no la de 260 kDa presente en la fracción 24.

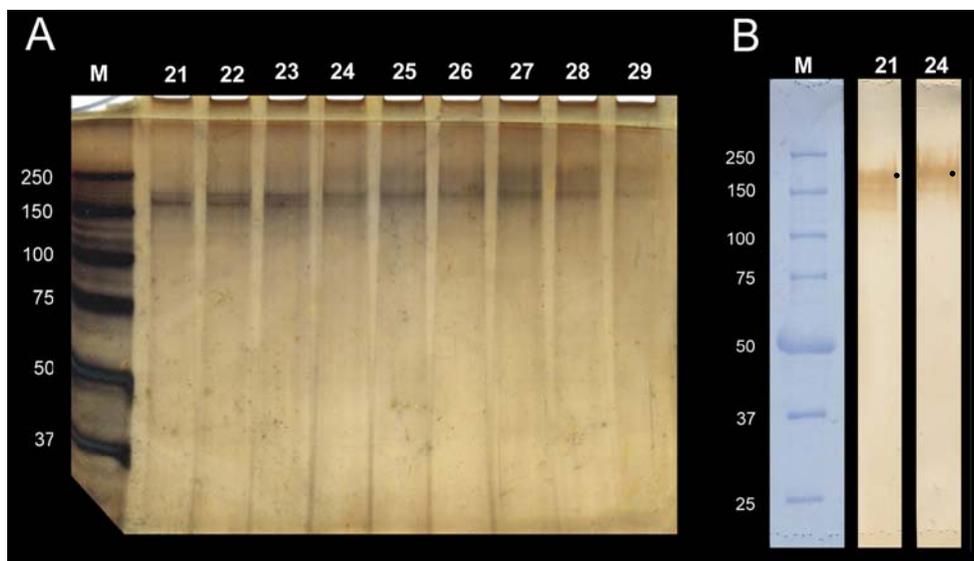


Fig. 19. Análisis Electroforético de las Fracciones Provenientes de la Macroelectroelución de un Botón Amibiano y Transferencia de la 21 y 24. **A** Tinción de plata de un gel desnaturalizante al 7.5% de las fracciones 21 a 29 obtenidas mediante electroelución en el sistema Prep Cell de una muestra amibiana inhibida con Iodacetamida y EDTA. **B** Western Blot de la fracción 21 y 24, utilizando como anticuerpo primario una dilución 1:200 del suero C₂₂.

Las fracciones 21 y 24 fueron concentradas en microconos de corte de peso molecular de 3,000 kDa.

c) Muestra Obtenida por Cromatografía de Inmunofinidad

Se realizó un western blot de la muestra obtenida por cromatografía de inmunofinidad, en condiciones reducidas con β -mercaptoetanol y sin reducir, en presencia de inhibidores. En la figura 20 se muestra la transferencia de esta muestra, y el western blot con C₂₂. En la muestra sin reducir (L), el anticuerpo reconoció claramente una banda con peso molecular de 260, así como de manera más tenue una banda de mayor peso molecular (~300 kDa) y la que se encuentra por arriba del marcador de 100, con un peso molecular aproximado de 110 kDa. El anticuerpo no identificó ningún péptido de la muestra reducida (LR).

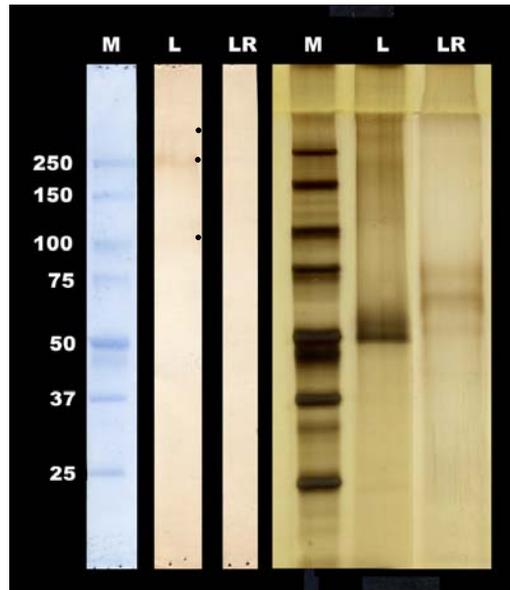


Fig. 20 Western Blot de la Muestra Obtenida por Cromatografía de Inmunoafinidad. Se llevó a cabo una transferencia de la muestra obtenida mediante cromatografía de inmunoafinidad, tratada (LR) o sin tratar (L) con β -mercaptoetanol. Derecha: análisis electroforético del apartado 2.2.3. Izquierda: western blot en el que se utilizó como anticuerpo primario una dilución 1:500 de C₂₂, un secundario peroxidado y se reveló con DAB.

Se contaba con 3 muestras diferentes de “lectina” para los ensayos con las monocapas de MDCK. Dos de ellas, la 21 y la 24 (de aquí en más denotadas como F21 y F24), provenían de la electroelución utilizando el sistema Prep Cell, y estaban realmente “puras”, la otra muestra, que de aquí en adelante nombraremos L, corresponde a la muestra obtenida por cromatografía de inmunoafinidad y como ya vimos estaba constituida por otras proteínas, además de la lectina de 260 kDa, y probablemente constituya el complejo de lectina tal y como se encuentra en la amiba. Sin embargo, resulta muy interesante el poder disponer de ambos tipos de muestras, sobre todo porque lo que estamos planteando como hipótesis de trabajo, es que, precisamente “una parte de ese complejo” es la que dispara o suscita la apertura de las uniones estrechas de las células MDCK en monocapa.

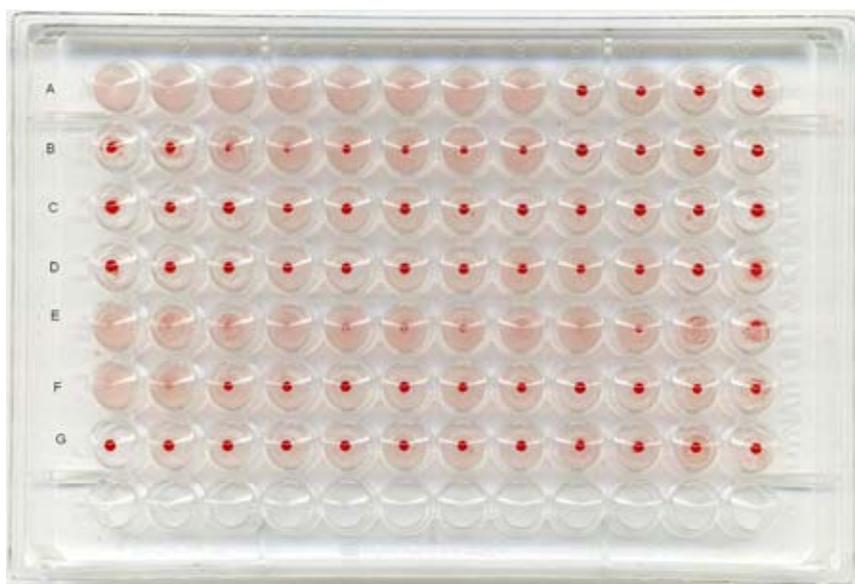


Fig. 21. Ensayo de Hemaglutinación de las Muestras 21, 24 y L. Se utilizó para el ensayo una suspensión de eritrocitos de sangre humana tipo A al 2%. **A:** control positivo *Vicia villosa* (50 μ g), **B:** muestra 21 (12.5 μ g), **C:** muestra 24 (4 μ g), **D:** buffer de diálisis de las muestras 21 y 24, **E:** muestra L (1 μ g), **F:** buffer de diálisis de la muestra L, **G:** control negativo BSA.

Antes de llevar a cabo los ensayos con las células MDCK, quisimos hacer un ensayo de hemaglutinación a las muestras 21, 24 y L. Las tres muestras fueron exhaustivamente dializadas para retirar el detergente empleado durante su purificación (SDS en el caso de las dos primeras, y NP 40 en el caso de la última), quedando en un amortiguador de fosfatos a pH 7.2.

Se utilizaron como controles para cada muestra la solución del último cambio de diálisis. En la figura 21 se muestra el resultado del ensayo de hemaglutinación. El control positivo de este ensayo fué la hemaglutinación en presencia de la lectina *Vicia villosa*, que tiene afinidad por N-acetil galactosamina y corresponde en la figura a la hilera A; se observa que ésta hemaglutina hasta el pozo 8 (que corresponde a una dilución de 1/128). La hilera B corresponde a la muestra 21 en donde, si bien en los primeros tres pozos se observa un halo alrededor del botón de eritrocitos, la presencia del botón indica que no hubo hemaglutinación. En la muestra 24, ya en el primer pozo se distingue un claro botón, indicativo de que no hubo hemaglutinación. La hilera D corresponde al ensayo de la última solución de

diálisis de las muestras 21 y 24 (este ensayo se llevó a cabo como control de dichas muestras, ya que trazas o restos de detergente en el amortiguador podrían lisar los eritrocitos y de esta manera, confundir el resultado obtenido), en ella se observa que desde el primer pozo se formó un botón muy definido, indicando la ausencia de detergente y de lisis. La hilera E correspondiente a la muestra L, indica la ausencia de botón de eritrocitos definido hasta el pozo 10, mientras que la hilera F, donde se ensayó la solución de la última diálisis de la muestra L, no se observa botón de eritrocitos hasta el pozo 3, es decir, en el amortiguador de la muestra L hay restos de detergente. Ahora bien, si a la hilera E de la muestra L le restamos el ensayo del amortiguador de la hilera F, el resultado es que la muestra L tiene un efecto sobre los eritrocitos. Sin embargo, éste no parece deberse a hemaglutinación ya que se distingue un halo que no se observa en los pozos positivos de *Vicia villosa* (hilera A), probablemente se trata de lisis de eritrocitos, debido al componente de esta muestra que tiene actividad proteolítica. La última hilera corresponde al ensayo con BSA y representa el control negativo.

Aún cuando no se ha resuelto si existe más de un CRD en la lectina, se ha referido (135) la acción hemaglutinante de la misma purificada por cromatografía de afinidad de galactosa. En nuestro caso, ninguna de las muestras ensayadas indujo hemaglutinación de eritrocitos humanos tipo A.

4. EFECTO DE LAS DIFERENTES MUESTRAS DE LECTINA PURIFICADAS EN LA APERTURA DE LAS UNIONES ESTRECHAS DE LAS CÉLULAS MDCK EN MONOCAPA

Para elegir tanto la concentración de la muestra por célula blanco, así como el tiempo de incubación de la misma con la monocapa, nos basamos en algunos artículos en los que se utilizó la lectina pura: W.A. Petri *et al* (68), L.D. Saffer y W.A. Petri (83) y S. Rawal *et al* (135). De acuerdo a ello, decidimos utilizar 1 µg de muestra/monocapa (5×10^5 células MDCK). La muestra, preparada en PBS con calcio se incubó durante 1 hora con la monocapa y enseguida se hicieron las determinaciones de RET, o bien, las preparaciones se fijaron y tiñeron para su

análisis microscópico. En la tabla 3 se muestran los valores de RET de las monocapas MDCK después de su incubación durante 1 hora con una de las tres muestras de lectina purificada.

	RET Ωcm^2	RET %
MONOCAPAS CONTROL (4)	459.5 \pm 10.1	100 \pm 2%
MONOCAPAS + L (3)	487.2 \pm 55.6	106 \pm 12%
MONOCAPAS + F21 (3)	420.3 \pm 89.8	91.5 \pm 20%
MONOCAPAS + F24 (3)	456.1 \pm 70.6	99.3 \pm 15%

Tabla 3. Efecto de las Muestras de Lectina Purificadas en la RET de Monocapas MDCK. Las muestras L, F21 y F24 se incubaron durante 1 hora con monocapas de MDCK. El número en paréntesis indica el número de monocapas para ese ensayo. En todos los casos se usó 1 μg de muestra: 5×10^5 células MDCK. Al término de 1 hora de incubación se determinó la RET. Se muestran los valores en términos de Ωcm^2 así como en % relativo al control.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Dunnett, no encontrándose diferencias significativas entre las monocapas experimentales y las control. Como puede verse, el error estándar es muy alto en los tres ensayos experimentales, porque hubo mucha dispersión en las determinaciones y fueron pocos datos.

Se llevaron a cabo experimentos idénticos a los anteriores, excepto porque las monocapas de MDCK se habían formado sobre cubreobjetos de vidrio para los estudios de microscopía óptica. Tras haber sido incubadas con la muestra en cuestión durante 1 hora, las monocapas se fijaron y se tiñeron con nitrato de plata para destacar el cemento intercelular y se contratiñeron con hematoxilina.

En la figura 22 se muestran las micrografías de una monocapa control (A), y de las tres monocapas experimentales: (B) incubada con L, (C) incubada con F21, y (D) incubada con F24.

Encontramos que el aspecto microscópico de las monocapas experimentales fué muy similar al control en cuanto a rebordes celulares y algunos núcleos condensados (¿apoptóticos?). La única diferencia fue el hallazgo ocasional de espacios intercelulares en la monocapa incubada con F21.

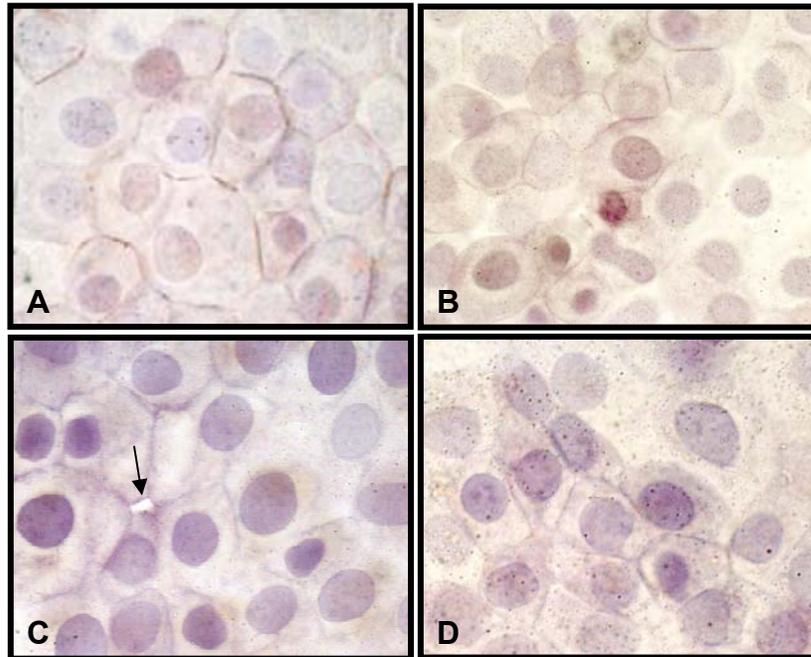


Fig. 22. Monocapas de Células MDCK Tratadas con las Muestras de Lectina. Experimentos idénticos a los realizados para las determinaciones de RET se llevaron a cabo con monocapas de MDCK desarrolladas sobre cubreobjetos de vidrio. Las monocapas se incubaron con las muestras de lectina durante 1 hora, se fijaron con formol y se tiñeron con nitrato de plata para resaltar el cemento intercelular, posteriormente fueron contrateñidas con Hematoxilina. **A:** monocapas control; **B:** monocapas tratadas con L; **C:** monocapas tratadas con F21 y, **D:** tratadas con F24.

CONCLUSIONES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SEGUNDA PARTE .

Recordemos que la necesidad de la segunda parte del trabajo surgió del hallazgo inicial que indicó que la lectina específica de galactosa es la responsable de la citotoxicidad de *E. histolytica*, en nuestro sistema *in vitro*, cuantificada ésta en términos de decremento en la RET de las monocapas MDCK, y traducida morfológicamente en la aparición de espacios intercelulares. Aunque estaba bien establecido que la adherencia del trofozoito a la célula blanco era un evento crucial en la patogenicidad del parásito, y que ésta requería de la lectina Gal/NAcGal, se desconocía si esta molécula estaba implicada también en algunos

de los procesos inmediatos subsecuentes, como la apertura de las uniones estrechas. Dicho de otra manera “¿podía la lectina Gal/NAcGal *per se* inducir la apertura de las uniones estrechas responsables de la RET de la monocapa de MDCK?”, y para responder a esta pregunta era indispensable purificar la lectina.

La obtención de esta molécula pura parecía entonces una cuestión relativamente sencilla, pues su purificación mediante cromatografía de afinidad de galactosa o de inmunofinidad (con anticuerpos monoclonales) había sido descrita en el *Methods in Enzymology* (122). Mediante cromatografía de afinidad de galactosa siguiendo la técnica descrita, yo obtuve muestras constituidas por cuando menos 4 péptidos; lo anterior me llevó a intentar la purificación mediante otras metodologías.

Los resultados de la segunda parte fueron discutidos conforme se fueron mostrando; a continuación presento las conclusiones:

1) Mediante macroelectroelución de un lisado total amibiano obtuve una fracción pura constituida por 2 péptidos, con pesos moleculares en SDS PAGE de 260 y 170 kDa. La masa atómica de los péptidos en la muestra, determinada por espectroscopia de masas, resultó ser de: 63 y 143 kDa, esta última coincidió con la masa atómica referida en la literatura (131) para la subunidad pesada de la lectina. La secuencia aminoacídica de 8 y 12 residuos, respectivamente, indicó que se trataba del péptido precursor de la subunidad ligera y de la subunidad pesada de la lectina Gal/NAc Gal.

2) La conformación espacial de la lectina Gal/NAcGal se modifica en el proceso de electroelución. Esta conclusión se basa en el resultado obtenido con el anticuerpo monoclonal comercial, el cual, reconoce la banda de 260 kDa correspondiente al heterodímero de la lectina presente en el lisado amibiano antes de la electroelución, pero no la reconoce en las fracciones obtenidas después de esta técnica. Aunque no se menciona explícitamente, dicho anticuerpo está dirigido contra la subunidad pesada de la lectina amibiana, y, el hecho de que los laboratorios que lo emplean con especímenes fecales comentan que el

ensayo de ELISA con este anticuerpo no es sensible cuando las muestras han sido congeladas, aunado a nuestros resultados, sugiere que reconoce un epítoto conformacional.

El disponer de una muestra pura de la lectina Gal/NAcGal amibiana nos permitió utilizarla para inmunizar un conejo y así obtener anticuerpos policlonales contra la lectina.

3) La fracción 22 está constituida por los mismos péptidos que la 23. Esta conclusión se basa en los resultados obtenidos: el suero hiperinmune del conejo 22 (C₂₂) (inmunizado precisamente con esa fracción) reconoce a la fracción 23 pura; además, de todas las proteínas presentes en el lisado amibiano, sólo reconoce estructuras relativas a la subunidad pesada de la lectina.

4) Mediante cromatografía de inmunoafinidad (con los anticuerpos de C₂₂), se obtiene, a partir de un lisado amibiano, una muestra, que efectivamente contiene a la lectina (los anticuerpos de C₂₂ la reconocen en la transferencia), pero está conformada además por otras proteínas, de las cuales, cuando menos una, tiene actividad enzimática (si no se trata con inhibidores, la muestra se degrada).

5) Obtuvimos dos tipos de muestra amibiana que contenían a la lectina Gal/NAcGal: muestras estrictamente puras correspondientes a las fracciones obtenidas por macroelectroelución, y la muestra constituida por varios péptidos, además de la lectina, obtenida por cromatografía de inmunoafinidad. Ninguna de las muestras hemaglutinó eritrocitos humanos de tipo A.

6) Los resultados obtenidos, tanto por análisis microscópico, como en términos de la RET de las monocapas coincubadas con las diferentes muestras de la lectina (pura o como complejo protéico) nos indican que en esas condiciones experimentales (coincubación durante una hora con 1µg de muestra/monocapa), la lectina Gal/NAcGal no tuvo un efecto aparente en la apertura de las uniones estrechas de la monocapa de células MDCK.

Si bien llevamos a cabo nuestro objetivo planteado al inicio de esta tesis, es importante señalar que es necesario estudiar con más detalle las muestras que purificamos de la lectina, pues aún quedan detalles por aclarar, por ejemplo: no descartamos la posibilidad de que los anticuerpos C₂₂ también reconozcan a la subunidad ligera (la banda reconocida en la fracción 14 de la microelectroelución); dichos anticuerpos reconocen epítopes secuenciales, puesto que reconocen la lectina en el lisado amibiano antes de la electroelución, (con diferente conformación espacial), sin embargo, ¿por qué no reconocen la banda de peso de 260 kDa presente en las muestras obtenidas por electroelución, como la que se observa en la fracción 6 de la microelectroelución, o la que se ve en la fracción 24 obtenida por macroelectroelución?; en lo que se refiere a la muestra obtenida por cromatografía de inmunoafinidad: ¿por qué al reducir la muestra, la subunidad de 170 kDa no aparece?; ¿cuál es la especificidad de la(s) enzima(s) presentes en la muestra?.

Como ya mencionamos en este trabajo, cada vez hay más datos sugestivos de que varias proteínas se encuentran asociadas a la lectina Gal/NAcGal, apoyando la posibilidad de que actúen como un complejo protéico. Lo anterior parece altamente probable, basta con echar un vistazo a los receptores de los linfocitos T, o los receptores de citocinas presentes en diferentes células blanco en animales superiores, por mencionar sólo algunos ejemplos, estos receptores están constituidos por varias proteínas que funcionan en conjunto en perfecta sincronía, de manera tal, que transducen al interior celular distintas señales Tanto la subunidad pesada, como la ligera y la intermedia, están codificadas por familias de varios genes, lo cual plantea la posibilidad de que el complejo de lectina se constituya con diferentes isoformas de las subunidades y quizás sea esta la razón por la cual un complejo protéico esté implicado en numerosas funciones tales como la adherencia, citotoxicidad, resistencia a complemento, el proceso de enquistamiento, inducción de apoptosis; por mencionar algunas.

OTROS ESTUDIOS RELACIONADOS

1. ANALISIS DE LA EXPRESION Y LOCALIZACION DE LA LECTINA Gal/NAcGal EN LAS AMIBAS VIRULENTAS Y NO VIRULENTAS DE LA CEPA HM1:IMSS.

En los últimos años, la investigación en el campo de la Amibiasis ha tenido logros sustanciales que han culminado, como resultado de un esfuerzo conjunto, en la publicación del genoma completo de la amiba (140). Sin embargo, uno de los problemas que aún no se ha resuelto, y que probablemente sea la clave para resolver el enigma de la patogenicidad de este parásito, es el hecho de que al cultivar axénicamente trofozoitos amibianos por tiempos prolongados, éstos pierden su virulencia –determinada ésta por su habilidad para producir abscesos hepáticos en el modelo experimental del hámster– y para recuperarla, es necesario inocular los trofozoitos en hámsters y colectarlos de las lesiones producidas en el animal para empezar de nuevo el cultivo axénico.

En nuestro laboratorio, se cultivan las dos variedades de la cepa HM1:IMSS: la “virulenta”, que periódicamente se “pasa” por hígado de hámster, y la “no virulenta”, axénicamente cultivada por más de dos años, y que ha perdido su capacidad de producir abscesos en hígado de hámster.

El objetivo de este trabajo fué comparar en las dos variedades la capacidad amibiana para disminuir la resistencia eléctrica transepitelial (RET) de monocapas de células MDCK. Puesto que dicha habilidad ocurre por un mecanismo contacto-dependiente, se analizó la expresión y localización de la lectina Gal/NAcGal, en ambas variedades, utilizando para ello, los anticuerpos policlonales del conejo C₂₂. Inicialmente se llevó a cabo un análisis electroforético comparativo del lisado total de un botón amibiano proveniente de la variedad virulenta y no virulenta. En la figura 23 se muestra un gel desnaturalizante al 7.5% teñido con plata; el patrón protéico de una y otra variedad es prácticamente idéntico en la zona de pesos moleculares altos correspondientes a la subunidad pesada y al heterodímero de la lectina (por arriba de 150 kDa), sin embargo, entre el marcador de 50 y el de 75

kDa, en la variedad virulenta (V) aparece más densa una banda (señalada con una flecha), correspondiente a una proteína de un peso molecular aproximado de 60 kDa, con respecto al patrón de la no virulenta (NV), indicando, probablemente (puesto que no se sometió a análisis densitométrico), una mayor expresión de dicha proteína en la variedad virulenta.

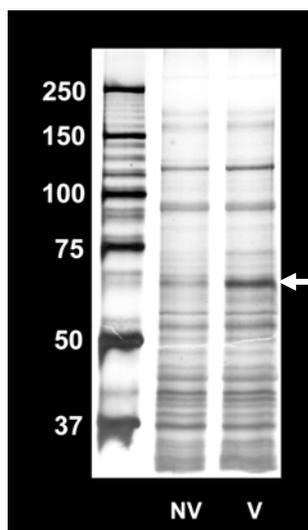


Fig. 23. Análisis Electroforético de las Variedades “Virulenta” y “No Virulenta”. Tinción de plata de un gel desnaturalizante al 7.5% de un lisado total (proveniente de un botón amibiano inhibido con IA 50 mM y EDTA 10 mM, congelado y descongelado) de la variedad “no virulenta” (NV) y “virulenta” (V). Carril extrema izquierda: marcadores de peso molecular, se montó la misma concentración de proteína de NV y V.

En la figura 24 se muestran dos transferencias de un mismo lisado de una y otra variedad; la transferencia **A** fue tratada con el anticuerpo policlonal C₂₂, mientras que la **B** se trató con el anticuerpo monoclonal comercial y ambas fueron reveladas con DAB. En cada transferencia se montó la misma concentración de proteína de una y otra variedad. En la transferencia **A**, tratada con el anticuerpo policlonal, se observa que en ambas muestras aparecen teñidas tres bandas con pesos moleculares de 150, 170 y 260 kDa, en ambas variedades la intensidad de dichas bandas es muy similar, sin embargo, en las virulentas aparecen teñidas unas bandas de pesos moleculares bajos, que pudieran corresponder a productos de degradación de la lectina, debido probablemente a que la actividad enzimática en la variedad virulenta sea mayor y no haya sido completamente inhibida. En la transferencia **B** aparecen teñidas las mismas 3 bandas de 150, 170 y 260 kDa en

ambas variedades y no se observan péptidos de bajo peso molecular teñidos, probablemente esto se deba a que el anticuerpo utilizado en esta transferencia

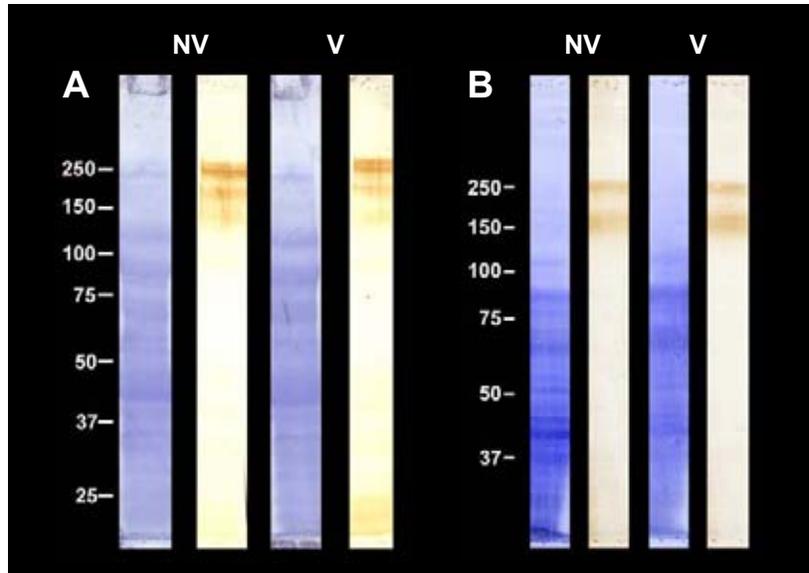


Fig. 24 Transferencias de un Lisado Total Amibiano de las Variedades Virulenta y No Virulenta. Transferencia **A**: las tiras se trataron con el anticuerpo policlonal C₂₂, el par de tiras de la izquierda corresponden a No Virulentas, mientras que el par de la derecha corresponde a Virulentas, Transferencia **B**: las tiras se trataron con el anticuerpo monoclonal comercial, pareja izquierda correspondiente a muestra No Virulenta, pareja de la derecha: muestra Virulenta. Cada pareja de tiras corresponde a una misma variedad: la tira teñida con Coomassie muestra todas las proteínas de la muestra. En una misma transferencia, se montó igual concentración de proteína de ambas variedades.

sea un monoclonal, que como ya hemos comentado, parece reconocer un epítipo conformacional. Se determinó la densitometría de las tiras de esta transferencia (con un analizador Chemi Imager 4,000 Alpha Innotech Corp.), resultando no haber diferencias significativas entre una y otra variedad.

La localización de la lectina en ambas variedades de amibas de la cepa HM1:IMSS se llevó a cabo en cortes de pellets amibianos incluidos en parafina, teñidos mediante la técnica de “sándwich”, y contrateñidos con hematoxilina; las preparaciones fueron analizadas por microscopía óptica. Se utilizó como anticuerpo primario el policlonal de C₂₂. En la figura 25 se muestran las micrografías correspondientes a las variedades no virulenta y virulenta.

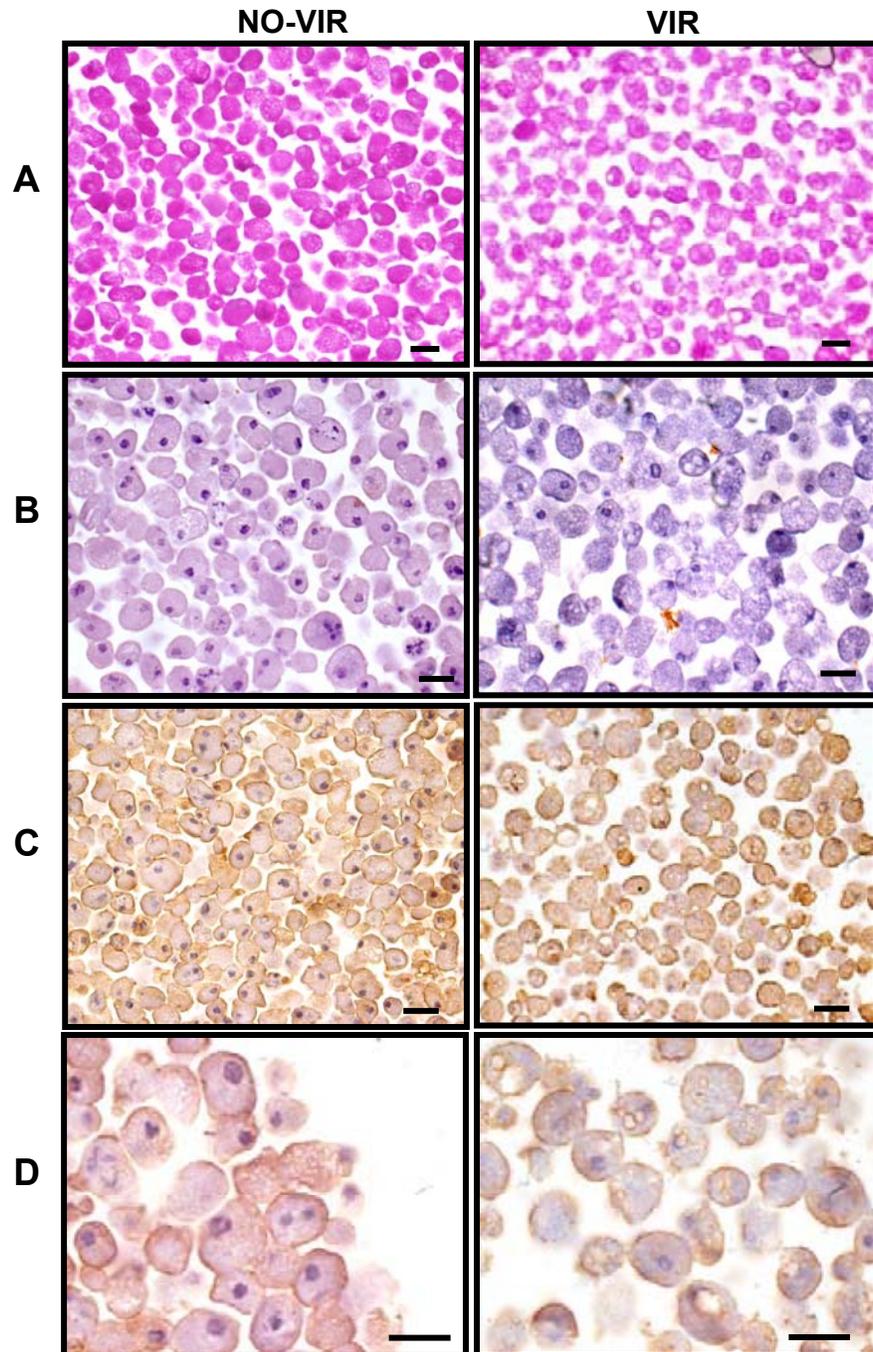


Fig. 25. Micrografías de Amibas No Virulentas y Virulentas . Cortes de botones de amibas incluídos en parafina. **A:** tinción de PAS, **B:** se utilizó como anticuerpo primario el suero preinmune de C₂₂, **C:** se utilizó como anticuerpo primario el suero hiperinmune de C₂₂, **D:** mayor aumento de la preparación anterior. El anticuerpo secundario utilizado fue de cabra peroxidado anti Ig's de conejo; se reveló con DAB y contratiñó con Hematoxilina.

En **A** se muestra el aspecto de los trofozoitos de una y otra variante teñidos con PAS (Periodic Acid-Schiff Reaction), no se observan diferencias morfológicas entre ellas. En **B** las preparaciones fueron tratadas con el suero preinmune del conejo C₂₂ y con el secundario peroxidado anti Ig's de conejo y constituye el control negativo; donde se observa que no hay tinción café en la preparación. La micrografía **C** muestra las preparaciones tratadas con suero hiperinmune del conejo C₂₂ específico para la lectina Gal/NAcGal y en **D** se muestra una amplificación en la que claramente puede verse que la lectina está presente en ambas variantes, y que ésta se localiza fundamentalmente en la membrana plasmática del trofozoito tanto en las amibas “virulentas” como en las “no virulentas”.

A continuación se llevaron a cabo experimentos para determinar el efecto de una y otra variante sobre una monocapa de células MDCK. Se utilizó una proporción de 1:5 amiba:células MDCK, se les coincubó durante 30 minutos y se determinó la RET de las monocapas. Los resultados resumidos se muestran en la tabla 4.

MONOCAPAS CONTROL (9)	MONOCAPAS + AMIBAS VIR (10)	MONOCAPAS + AMIBAS NO VIR (9)
321.9 ± 4.9 Ωcm ²	10.9 ± Ωcm ²	7.2 ± Ωcm ²
100 ± 1.5%	3.4 ± 0.9%	2.3 ± 0.6%

Tabla 4. RET de Monocapas de MDCK Coincubadas con Amibas Virulentas y No Virulentas. Las monocapas de células MDCK fueron incubadas con amibas de la cepa HM1:IMSS, virulentas o no virulentas durante 30 minutos. Las condiciones fueron idénticas a las de los experimentos de la tabla 1.

Las determinaciones de la RET indican que ambas variantes de la cepa HM1:IMSS son capaces de disminuir la resistencia eléctrica transepitelial. En la primera parte de esta tesis se demostró que la lectina específica de galactosa es, de todos los factores que han sido implicados en el efecto citotóxico de la amiba, el elemento más importante en nuestro modelo experimental *in vitro* que consiste en una monocapa de células de la línea celular MDCK. En este estudio

demostramos que la lectina Gal/NAcGal se expresa y localiza de igual forma en las amibas de la cepa HM1:IMSS virulenta o no virulenta y que ambas variantes de la misma cepa tienen la misma capacidad de ejercer un efecto citotóxico en nuestro sistema *in vitro* aún cuando claramente tienen una diferente capacidad para formar abscesos en hígado en el modelo del hámster. La conclusión de este pequeño estudio puede resumirse como sigue:

La citotoxicidad de HM1-IMSS in vitro no correlaciona con la virulencia de la misma in vivo.

2. EFECTO DE LAS AMIBAS HM1:IMSS CULTIVADAS EN PRESENCIA DE E-64 SOBRE LA MONOCAPA DE CELULAS MDCK.

En el año 2003, en nuestro laboratorio se llevó a cabo un estudio con amibas de la cepa HM1:IMSS cultivadas axénicamente en presencia del inhibidor E-64, Dichas amibas carecían por completo de actividad de proteasas de cisteína (CP); en el estudio se analizaron diferentes capacidades características del parásito, en modelos *in vitro* como *in vivo*, entre otras, la capacidad de estas amibas, para abatir la resistencia eléctrica transepitelial de una monocapa de células MDCK. La total inhibición de la actividad de CP en estas amibas se determinó mediante zimografía en gelatina, por determinación colorimétrica utilizando como sustrato azocaseína, y una técnica adicional que, a diferencia de las otras dos, detecta la actividad de CP en los trofozoitos intactos; en esta técnica se utiliza el péptido AMNP (Arg-Arg-4-methoxy-2-naphthylamide peptide), que constituye el sustrato para las proteasas de cisteína, y produce un aducto insoluble fluorescente con NSA (5-nitro-2-salicylaldehyde) tras su ruptura enzimática (136), detectable mediante microscopía de fluorescencia. Todo el estudio culminó con su publicación (58), en él se incluyó parte de la serie de experimentos relativos a la RET con estas amibas, incluyo en esta tesis el análisis completo.

En la tabla 5 se muestra el resumen los valores obtenidos de RET de monocapas incubadas con amibas cultivadas en presencia de E-64, los experimentos se llevaron a cabo esencialmente de la misma forma que en la sección 1.2 de resultados de esta tesis. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba de Tukey que nos permitió hacer comparaciones entre los diferentes grupos.

El grupo A corresponde a los valores de RET de monocapas control a los 30 minutos de incubación con medio TYI; el grupo B corresponde a los valores de monocapas MDCK incubadas durante 30 minutos con TYI + E-64, cabe mencionar que utilizando el péptido AMNP, se monitoreó, mediante microscopía de fluorescencia (en monocapas idénticas a las utilizadas en los experimentos de RET, pero desarrolladas sobre cubreobjetos de vidrio), la actividad de CP de las

A	B	C	D	E
MONOCAPAS CONTROL EN TYI (25)	MONOCAPAS CONTROL EN TYI-E64 (25)	MONOCAPAS +HM1 (25)	MONOCAPAS + (E64HM1) EN AUSENCIA DE E64 (25)	MONOCAPAS + (E64HM1) EN PRESENCIA DE E64 (25)
134.5 ± 4 Ωcm ²	126.1 ± 5 Ωcm ²	5.1 ± 1 Ωcm ²	42.9 ± 2 Ωcm ²	59.2 ± 6 Ωcm ²
100 ± 3 %	100 ± 4 %	3.8 ± 0.7 %	31.9 ± 1.5 %	46.9 ± 4.8 %

Tabla 5. Análisis de la RET de Monocapas MDCK Incubadas con Trofozoitos Cultivados en Presencia de E-64. La notación E64HM1 se refiere a amibas cultivadas axénicamente en presencia de 500 μM del inhibidor por cuando menos 72 horas. El tiempo de coincubación fue de 30 minutos y la proporción amiba:célula MDCK fue 1:5. Se muestran en % y Ωcm² los valores promedio del total de determinaciones para cada caso +- error estándar.

células MDCK incubadas en TYI con el inhibidor, el análisis realizado a diferentes tiempos, indicó que la actividad de CP en estas células al cabo de 3 horas era la misma a la de células MDCK incubadas en TYI solo. La diferencia entre los valores de estos dos grupos control no es estadísticamente significativa, ambos constituyeron los valores control de la RET de las monocapas. El grupo C se refiere al efecto producido por trofozoitos normales sobre esas monocapas, y como ya lo esperábamos, la resistencia disminuye hasta el 4% del valor control. El grupo D corresponde a las monocapas de MDCK incubadas durante 30 minutos con las amibas cultivadas en presencia de E-64, en este grupo el inhibidor no estuvo presente en el medio durante la coincubación, la RET de la monocapa disminuyó hasta el 32% del valor original. La diferencia entre el efecto producido por las amibas normales y el producido por las amibas con actividad CP totalmente inhibida, es estadísticamente significativa. El último grupo experimental, el E, está representado por las monocapas coincubadas durante 30 minutos con amibas totalmente inhibidas, en presencia de E-64 en el medio de coincubación, la RET de estas monocapas disminuyó hasta un valor de 59 Ωcm², que constituye el 47% del valor original de la monocapa. Al comparar los valores de los grupos D y E, resultó que la diferencia es estadísticamente significativa, con una $P= 0.042$,

sabemos que la actividad de CP de las células MDCK no disminuye tras su incubación durante 3 horas con E-64 (como se mencionó en la monocapa control), por otra parte, sabemos que la actividad de CP en las amibas inhibidas comienza a recuperarse alrededor de 12 horas después de retirar el inhibidor del medio de cultivo (58), de manera que no tenemos una explicación que justifique la diferencia entre el grupo D y E, que, por otra parte, es por muy poco, estadísticamente significativa.

Al principio de esta tesis se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que se determinó el daño producido por amibas pretratadas con diferentes inhibidores sobre monocapas MDCK; entre los inhibidores que se utilizaron se encontraba el E-64, utilizado como un inhibidor irreversible de proteasas de cisteína; en aquellos experimentos las amibas se incubaron con el inhibidor durante una hora antes de su coincubación con las monocapas y éste estuvo presente en el medio durante los 30 minutos de coincubación, de manera que las amibas estuvieron expuestas al inhibidor durante hora y media; es probable que el tiempo de incubación con el inhibidor no haya sido el suficiente para asegurar su completo acceso al interior de las amibas, y por ello, la actividad enzimática determinada mediante zimografía en geles de gelatina no siempre mostró el mismo grado de inhibición (entre 50-90%). Al respecto, se ha referido que el E-64 no permea al interior de las células durante períodos cortos de exposición *in vitro* (1 hr), después de períodos más prolongados muy posiblemente el inhibidor entra a las células por pinocitosis (137).

Sólo al cultivar axénicamente las amibas HM1:IMSS en presencia de E-64 logramos inhibir por completo su actividad de CP, lo anterior nos lleva a replantear nuestra conclusión del papel que desempeñan dichas enzimas en la caída de la RET:

La disminución de la RET de una monocapa de células MDCK al ser coincubada con amibas de la cepa HM1:IMSS es atribuible en parte (aproximadamente en un 30%) a las proteasas de cisteína de la amiba, aunque el papel que desempeñan en esta lesión dichas enzimas amibianas no es primordial, como lo es la lectina Gal/NAcGal

CAPÍTULO IV BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. The world health report-bridging the gaps. (1995). World Health Forum, **16**:377-385.
2. Caballero-Salcedo A., Viveros-Rogel M., Salvatierra B., Tapia-Conyer R., Sepúlveda Amor J., Gutiérrez G. & Ortiz-Ortiz L.(1994). Seroepidemiology of amebiasis in México. Am. J. Trop. Hyg., **50**: 412-419.
3. Haque R., Huston C.D., Hughes M., Houpt E & Petri W.A. (2003). Amebiasis. NEJM, **348**: 1565-1573.
4. Jessurum J., Barrón-Rodríguez L., Fernández-Tinoco G. & Hernández-Ávila M. (1992) The prevalence of invasive amebiasis is not increased in patients with AIDS. AIDS **6**: 307-309.
5. Brandt H. & Pérez Tamato R. (1970). Amibiasis. 1ª. ed., Ed. La Prensa Médica Mexicana, México D.F., 104 p.
6. Gathiram V. & Jackson T.F. (1987). A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. S. Afr. Med. J., **72**: 669-672.
7. Eichinger D. (1997). Encystation of Entamoeba parasites. Bioessays., **19**: 633-639.
8. Cho J. & Eichinger D. *Crithidia fasciculata* induces encystation of *Entamoeba invadens* in a galactose-dependent manner. (1998). J. Parasitol., **84**: 705-710.
9. Frisardi M., Ghosh S.K., Field J., Van Dellen K., Rogers R., Robbins P. & Samuelson J. (2000). The most abundant glycoprotein of amebic cyst walls (Jacob) is a lectin with five cys-rich, chitin-binding domains. Infect. Immun., **68**: 4217-4224.

10. Martínez-Palomo A. (1982). The Biology of *Entamoeba histolytica*. Tropical Medicine Research Studies Series. John Wiley & Sons, Chichester.
11. Calderón J., Muñoz M.L. & Acosta H.M. (1980). Surface redistribution and release of antibody-induced caps in *Entamoebae*. J. Exp. Med., **151**: 184-193.
12. Espinosa-Cantellano M. & Martínez-Palomo A. (1994). *Entamoeba histolytica*: Mechanism of surface receptor capping. Exp. Parasitol., **79**: 424-435.
13. Guillén N. (1996). Role of signaling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. Trends Microbiol., **4**: 191-19.
14. Aguilera P., Barry T & Tovar J. (2008). *Entamoeba histolytica* mitosomes: organelles in search of a function. Exp. Parasitol., **118**: 10-16.
15. Bredeston L.M., Caffaro C.E., Samuelson J. & Hirschberg C.B. (2005). Golgi and endoplasmic reticulum functions take place in different subcellular compartments of *Entamoeba histolytica*. J. Biol. Chem., **280**: 32168-32176.
16. Martínez-Palomo A. & Espinosa-Cantellano M. (1998). Intestinal amoebae. En: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Collier L., Balows A., Sussman M. editors. 9th ed. 5: Parasitology. London, U.K. Arnold; pp. 157–177.
17. González-Robles A. & Martínez-Palomo A. (1992). The fine structure of *Entamoeba histolytica* processed by cryo-fixation and cryosubstitution. Arch. Med. Res., **23**: 73-76
18. Argüello G., Valenzuela B. & Rangel E. (1992). Structural organization of chromatin during the cell cycle of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Arch. Med. Res., **23**: 77-80.

19. Orozco E., Baez-Camargo M., Gamboa L., Flores E., Valdes J. & Hernández F. (1993). Molecular karyotype of related clones of *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol., **59**: 29-40.
20. Petter R., Rozenblatt S., Schechtman D., Wellems T.E. & Mirelman D. (1993). Electrophoretic karyotype and chromosome assignments for a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Entamoeba histolytica*. Infect. Immun., **61**: 3574-3577.
21. Mann B.J. & Loftus B.J. (2002). The Molecular Biology and Pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. En: Pathogen Genomics Impact on Human Health. Shaw Karen J. ed. Humana Press. N.J., U.S.A.; pp 281-302.
22. Ravdin J.I. & Guerrant R.L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J. Clin. Invest., **68**: 1305-1313.
23. Ragland B.D., Ashley L.S., Vaux D.L. & Petri W.A. (1994). *Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. Exp. Parasitol., **79**: 460-467.
24. Huston C.D., Houpt E.R., Mann B.J., Hahn C.S. & Petri W.A. (2000). Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. Cell. Microbiol., **2**: 617-625.
25. Huston C.D., Mann B.J., Hahn C.S. & Petri W.A. (2000). Role of host caspases in cell killing by *Entamoeba histolytica*. Arch. Med. Res., **31**: S216-S217.
26. Seydel K.B. & Stanley S.L. (1998). *Entamoeba histolytica* induces host death in amoebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. Infect. Immun., **66**: 2980-2983.
27. Berninghausen O. & Leippe M. (1997) . Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. Infect.

Immun., **65**: 3615-3621.

28. Smith H. (1977). Microbial surfaces in relation to pathogenicity. *Bacteriol. Rev.*, **41**: 475-500. Citado en: Casadevall A. & Pirofski L.A. (1999). Host pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.*, **67**: 3703 -3713.
29. Wood W.B. & Davis B.D. (1980) Host-parasite relations in bacterial infections. p. 551-571. En B.D. Davis, R. Dulbecco, H.N. Eisen & H.S. Ginsberg. (ed.), *Microbiology*. Harper & Row, Cambridge, Mass. Citado en: Casadevall A. & Pirofski L.A. (1999). Host pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.*, **67**: 3703 -3713.
30. Henderson B., Poole S. & Wilson M.. (1996). Bacterial Modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol. Rev.*, **60**: 316-341. Citado en: Casadevall A. & Pirofski L.A. (1999). Host pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.*, **67**: 3703 -3713.
31. Casadevall A. & Pirofski L.A. (1999). Host pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.*, **67**: 3703 -3713.
32. Lynch E.C., Rosenberg I. & Gitler, C. (1982). An ion channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *EMBO J.*, **1**: 801-804.
33. Rosenberg I., Bach D., Loew L.M. & Gitler C. (1989). Isolation, characterization and partial purification of a transferable membrane channel (amoebapore) produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **33**: 237-247.
34. Young J.D., Young T.M., Lu L.P., Unkeless J.C. & Cohn Z.A. (1982). Characterization of a membrane-pore forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.*, **156**: 1677-1690.

35. Leippe M., Andra J., Nickel R., Tannich E., & Muller-Eberhard H.J. (1994). Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol. Microbiol.*, **14**: 895-904.
36. Hecht O., van Nuland N., Schleinkofer, K., Dingley A.J., Bruhn H., Leippe M. & Grotzinger J. (2004). Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.*, **279**: 17834-17841.
37. Leippe M., Bruhn H., Hecht O. & Grotzinger J. (2005). Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. *Trends Parasitol.*, **21**: 5-7.
38. Leippe M. & Muller-Eberhard H.J. (1994). The pore forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicol.*, **87**: 5-18.
39. Leippe M., Sievertsen H.J., Tannich E., & Horstmann R.D. (1995). Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*, **111**: 569-574.
40. Andra J., Herbst, R. & Leippe M. (2003). Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Dev. Comp. Immunol.*, **27**: 291-304.
41. Leippe M. (1997). Amoebapores. *Parasitol. Today*, **13**: 178-183.
42. Bracha R., Nuchamowitz Y., Leippe M. & Mirelman D. (1999). Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol. Microbiol.*, **34**: 463-472.
43. Bracha R., Nuchamowitz Y. & Mirelman D. (2003). Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular análisis and effect on pathogenicity. *Eukaryot. Cell*, **2**: 295-305.

44. Bujanover S., Katz U., Bracha R. & Mirelman D. (2003). A virulence attenuated amoebapore-less mutant of *Entamoeba histolytica* and its interaction with host cells. Intern. J. Parasitol., **33**: 1655-1663.
45. Zhang X., Zhang Z., Alexander D., Bracha R., Mirelman D. & Stanley S. (2004). Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. Infect. Immun., **72**: 678-683.
46. Bruchhaus I., Loftus B.J., Hall N. & Tannich E. (2003). The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during *in vitro* cultivation. Eukaryot. Cell, **2**: 501-509.
47. Bruchhaus I., Jacobs T., Leippe M. & Tannich E.. (1996). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. Mol. Microbiol., **22**: 255-263.
48. Olivos-García A., González-Canto A., López-Vancell R., García de León M.C., Tello E., Nequiz M., Montfort I. & Pérez-Tamayo R. (2003). Amebic cysteine proteinase 2 (EhCP2) plays either a minor or no role in tissue damage in acute experimental amebic liver abscess in hamsters. Parasitol. Res., **90**: 212-220.
49. Jacobs T., Bruchhaus I., Dandekar T., Tannich E. & Leippe M. (1998). Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. Mol. Microbiol., **27**: 269-276.
50. García-Rivera G., Rodríguez M.A., Ocadiz R., Martínez-López M.C., Arroyo R., González-Robles A. & Orozco E. (1999). *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. Mol. Microbiol., **33**: 556-568.

51. Que X. & Reed S.L. (2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**: 196-206.
52. Stanley S.L. & Reed S.L. (2001). Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial mucosal interactions: VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **280**: G1049-G1054.
53. Montfort I., Pérez-Tamayo R., González A., García de León M.C., Olivos A. & Tello E. (1993). Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes *in vitro*. *J. Parasitol.*, **79**: 98-105.
54. Ankri S., Stolarsky T. & Mirelman D. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol. Microbiol.*, **28**: 777-785.
55. Stanley S.L., Zhang T., Rubin D. & Li E. (1995). Role of *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect. Immun.*, **63**: 1587-1590.
56. Ankri S., Stolarsky T., Bracha R., Padilla-Vaca F. & Mirelman D. (1999). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect. Immun.*, **67**: 421-422.
57. Zhang Z., Yan L., Wang L., Seydel K., Li E., Ankri S., Mirelman D. & Stanley S. (2000). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 Beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol. Microbiol.*, **37**: 542-548.

58. Olivos-García A., Tello E., Néquiz M., González-Canto A., López-Vancell R., García de León M.C., Montfort I. & Pérez-Tamayo R. (2004). Cysteine proteinase activity in experimental acute amoebic liver abscesses in hamsters. *Parasitology*, **129**: 19-25.
59. Ravdin J.I., Sperelakis N. & Guerrant R.I. (1982). Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.*, **142**: 335-340.
60. Ravdin J.I., Murphy C. F., Guerrant R.L. & Long-Krug S.A. (1985). Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.*, **152**: 542-549.
61. Long-Krug S.A., Fischer K.J., Hysmith R.M. & Ravdin J.I. (1985). Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. *J. Infect. Dis.*, **152**: 536-541.
62. Garg N.K. & Das S.R. (1980). Lipid requirements for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *J. Biosci.*, **2**: 235-241.
63. Misra S.K., Mehdi H., Rastogi A.K. & Garg N.K. (1987). Increase in activity and biosynthesis of phospholipase A of *Entamoeba histolytica* by cholesterol passage. *Int. J. Parasitol.*, **17**: 1413-1420.
64. Vargas-Villarreal J., Martínez-Rodríguez H., Castro-Garza J., Mata-Cárdenas B.D., González-Garza M.T. & Said-Fernández S. (1995). Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and lysophospholipase L₁ activities. *Parasitol. Res.*, **81** : 320-323.
65. Vargas-Villarreal J., Olvera-Rodríguez A., Mata-Cárdenas B.D., Martínez - Rodríguez H.G., Said-Fernández S. & Alagón-Cano A. (1998). Isolation of an *Entamoeba histolytica* intracellular alkaline phospholipase A₂. *Parasitol. Res.*, **84**: 310-314.

66. Guerrant R.L., Bruschi J., Ravdin J.I., Sullivan J.A. & Mandell G.L. (1981). Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J. Infect. Dis.*, **143**: 83-93.
67. Petri W.A. Jr. & Ravdin J.I. (1987). Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: the role of amebic adherence and contact-dependent cytolysis in pathogenesis. *Eur. J. Epidemiol.*, **3**: 123-136.
68. Petri W.A. Jr., Smith R.D., Schlesinger P.H., Murphy C.F. & Ravdin J.I. (1987). Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.*, **80**: 1238-1244.
69. Petri W.A. Jr., Chapman M.D., Snodgrass T., Mann B.J., Broman J. & Ravdin J.I. (1989). Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.*, **264**: 3007-3012.
70. Mann B.J., Torian B.E., Vedvick T.S. & Petri W.A. Jr. (1991). Sequence of a cysteine-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**: 3248-3252.
71. Ramakrishnan G., Ragland B.D., Purdy J.E. & Mann B.J. (1996). Physical Mapping and expression of gene families encoding the N-acetyl-D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.*, **19**: 91-100.
72. McCoy J.J., Mann B.J., Vedvick T., Pak Y., Heimark D.B. & Petri W.A. Jr. (1993) Structural analysis of the light subunit of the *Entamoeba histolytica* adherence lectin. *J. Biol. Chem.*, **268**: 24 223- 24 231.
73. McCoy J.J., Mann B.J., Vedvick T. & Petri W.A. Jr. (1993). Sequence analysis of genes encoding the *Entamoeba histolytica* galactose-specific adhesin light subunit. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **61**: 325-328.

74. Ramakrishnan G., Lee S., Mann B.J. & Petri W.A. Jr. (2000). *Entamoeba histolytica*: Deletion of the GPI anchor signal sequence on the Gal/GalNAc lectin light subunit prevents its assembly into the lectin heterodimer. *Exp. Parasitol.*, **96**: 57-60.
75. Cheng X.J., Tsukamoto H., Kaneda Y. & Tachibana H. (1998). Identification of the 150 kDa surface antigen of *Entamoeba histolytica* as a galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable lectin. *Parasitol. Res.*, **84**: 632-639.
76. Petri W.A. Jr, Haque R. & Mann B.J. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **56**: 39-64.
77. Cheng X.J., Hughes M.A., Huston C.D., Loftus B., Gilchrist C.A., Lockhart L.A., Ghosh S., Miller-Sims V., Mann B.J., Petri W.A. Jr. & Tachibana H. (2001). Intermediate subunit of the Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* is a member of a gene family containing multiple CXXC sequence motifs. *Infect. Immun.*, **69**: 5892-5898.
78. Petri W.A. Jr., Snodgrass T.L., Jackson T.F.H.G., Gathiram V., Simjee A.E., Chadee K. & Chapman M.D. (1990). Monoclonal antibodies directed against the galactose-binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence. *J. Immunol.*, **144**: 4803-4809.
79. Vines R.R., Ramakrishnan G., Rogers J.B., Lockhart L.A., Mann B.J. & Petri W.A. Jr. (1998). Regulation of adherence and virulence by *Entamoeba histolytica* lectin cytoplasmic domain, which contains a beta 2 integrin motif. *Mol. Biol. Cell*, **9**: 2069-2079.
80. Ravdin J.I., Croft B.Y. & Guerrant R.L. (1980). Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.*, **152**: 377-390.
81. Li E., Becker A. & Stanley S.L. (1989). Chinese hamster ovary cells deficient in N-acetyl-glucosaminyltransferase I activity are resistant to *Entamoeba histolytica*-mediated cytotoxicity. *Infect. Immun.*, **57**: 8-12.

82. Ravdin J.I., Stanley P., Murphy C.F. & Petri W.A. Jr. (1989). Characterization of cell surface carbohydrate receptors for *Entamoeba histolytica* adherence lectin. *Infect. Immun.*, **57**: 2179-2186.
83. Saffer L.D. & Petri W.A. Jr. (1991). Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. *Infect. Immun.*, **59**: 4681-4683.
84. Li E., Becker A. & Stanley S.L. (1988). Use of Chinese hamster ovary cells with altered glycosylation patterns to define the carbohydrate specificity of *Entamoeba histolytica* adhesion. *J. Exp. Med.*, **167**: 1725-1730.
85. Mann B.J., Chung C.Y., Dodson J.M., Ashley L.S., Braga L.L. & Snodgrass T.L. (1993). Neutralizing monoclonal antibody epitopes of the *Entamoeba histolytica* galactose adhesin map to the cysteine-rich extracellular domain of the 170-kDa subunit. *Infect. Immun.*, **61**: 1772-1778.
86. Dodson J.M., Lenkowski P.W. Jr, Eubanks A.C., Jackson T.F.G.H., Napodano J., Lyerly D.M., Lockhart L.A., Mann B.J. & Petri W.A. Jr. (1999). Infection and immunity mediated by the carbohydrate recognition domain of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *J. Infect. Dis.*, **179**: 460-466.
87. Pillai D.R., Wan P.S.K., Yau Y.C.W., Ravdin J.I. & Kain K. (1999). The cysteine-rich region of the *Entamoeba histolytica* adherence lectin (170-kilodalton subunit) is sufficient for high-affinity Gal/GalNAc-specific binding *in vitro*. *Infect. Immun.*, **67**: 3836-3841.
88. Ankri S., Padilla-Vaca F., Stolarsky T., Koole L., Katz U. & Mirelman D. (1999). Antisense inhibition of expression of the light subunit (35kDa) of the Gal/GalNAc lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Mol. Microbiol.*, **33**: 327-337.

89. Katz U., Ankri S., Stolarsky T., Nuchamowitz Y. & Mirelman D. (2002). *Entamoeba histolytica* expressing a dominant negative N-truncated light subunit of its Gal-lectin are less virulent. *Mol. Biol. Cell*, **13**: 4256-4265.
90. Coudrier E., Amblard F., Zimmer C., Roux P., Olivo-Marín J.C., Rigotherier M.C. & Guillén N. (2005). Myosin II and the Gal-GalNAc lectin play a crucial role in tissue invasion by *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.*, **7**: 19-27.
91. Tavares P., Rigotherier M.C., Khun H., Roux P., Huerre M. & Guillén N. (2005). Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: a delicate balance. *Infect. Immun.*, **73**: 1771-1778.
92. Braga L.L., Ninomiya H., McCoy J.J., Eacker S., Wiedmer T., Pham C., Wood S., Sims P.J. & Petri W.A. Jr. (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.*, **90**: 1131-1137.
93. Gutiérrez-Kobeh L., Cabrera N. & Pérez-Montfort R. (1996). A mechanism of acquired resistance to complement-mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.*, **83**: 234-241.
94. Cereijido M., Ehrenfeld J., Meza I. & Martínez-Palomo A. (1980). Structural and functional membrane polarity in cultured monolayers of MDCK cells. *J. Membr. Biol.*, **52**: 147-159.
95. Martínez-Palomo A., González-Robles A., Chávez B., Orozco E., Fernández-Castelo S. & Cervantes A. (1985). Structural bases of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.*, **32**: 166-175.
96. González-Robles A. & Martínez-Palomo A. (1982). Morfología de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* en substratos naturales. Estudio mediante microscopía electrónica de barrido. *Arch. Invest. Med.*, **13**: 145-157.

97. Orozco E., Martínez-Palomo A., González-Robles A., Guarneros G. & Mora Galindo J. (1982). Las interacciones entre lectina y receptor median la adherencia de *E. histolytica* a células epiteliales. Relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. Arch. Invest. Med., **13**: 159-167.
98. Orozco E., Fernández-Castelo, S. & Martínez-Palomo A. (1982). Detección del daño celular temprano producido por *Entamoeba histolytica* sobre epitelios. Arch. Invest. Med., **13**: 169-175.
99. Rodríguez M.A., Hernández F., Santos L., Valdez A. & Orozco E. (1989). *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. Mol. Biochem. Parasitol., **37**: 87-100.
100. Santos-Argumedeo L. & Orozco E. (1990). Caracterización de proteínas de *Entamoeba histolytica* que participan en la interacción con células blanco de diferentes especies. Arch. Invest. Med., **21**: 197-202.
101. De la Cruz H. F., Argüello C. & Orozco E. (1990). Identificación y localización de moléculas que intervienen en la interacción entre *Entamoeba histolytica* y células epiteliales. Arch. Invest. Med., **21**: 267-272.
102. Zak J., Werner Schneider S., Eue I., Ludwig T. & Oberleithner H. (2000). High-resistance MDCK-C7 monolayers used for measuring invasive potency of tumour cells. Eur. J. Physiol., **440**: 179-183.
103. Cereijido M., Shoshani L. & Contreras R.G. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol., **279**: G477-G482.
104. Leroy A., De Bruyne G., Mareel M., Nokkaew C., Bailey G. & Nelis H. (1995). Contact-dependent transfer of the galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica* to the lateral surface of enterocytes in culture. Infect. Immun., **63**: 4253-4260.

105. Pacheco J., Shibayama M., Campos, R., Beck D.L., Houpt E., Petri W.A. & Tsutsumi V. (2004). *In vitro* and *in vivo* interaction of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin with various target cells: an immunocytochemical analysis. *Parasitol. Int.*, **53**: 35-47.
106. Pacheco Y.J., Campos R.R., Serrano L.J., Espinosa C.M., Petri W.A., Tsutsumi V. & Shibayama M. (2000). *Entamoeba histolytica*: localization of the Gal/GalNAc adherence lectin in experimental amebic liver abscess. *Arch. Med. Res.*, **31**: S242-S244.
107. Leroy A., Lauwaet T., De Bruyne G., Cornelissen M. & Mareel M. (2000). *Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. *FASEB J.*, **14**: 1139-1146.
108. Leroy A., Mareel M., De Bruyne G., Bailey G. & Nelis H. (1994). Metastasis of *Entamoeba histolytica* compared to colon cancer: one more step in invasión. *Invasion & Metastasis*, **14**: 177-191.
109. Diamond L.S., Harlow D.R. & Cunic C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **72**: 431-432.
110. Olivos A., Ramos E., Nequiz M., Barba C., Tello E., Castañón G., González A., Martínez R.D., Montfort I. & Pérez Tamayo R. (2005). *Entamoeba histolytica*: Mechanism of decrease of virulence of axenic cultures maintained for prolonged periods. *Exp. Parasitol.*, **110**: 309-312.
111. Kurecki L., Kress L.F. & Lajowski M. (1979). Purification of human plasma α -2-macroglobulin and α -1-proteinase inhibitor using zinc chelate chromatography. *Anal. Biochem.*, **99**: 415-420.
112. Rosenthal A. & Geyer R.P. (1960). A synthetic inhibitor of venom lecithinase. *A. J. Biol. Chem.*, **235**: 2002-2006.
113. Becker I., Pérez-Tamayo R., Montfort I., Alvizouri A.M. & Pérez-Montfort R. (1988). *Entamoeba histolytica*: role of amebic proteinases and

- polymorphonuclear leukocytes in acute experimental amebiasis in the rat. *Exp. Parasitol.*, **67**: 268-280.
114. Lumb M.R., Roseblade C.K., Helmig R., Uldbjerg N., Sullivan M.H.F. & Elder M.G. (1990). Use of a new simplified assay for phospholipase A₂ to measure bacterial enzymes levels. *Clin. Chim. Acta*, **189**: 39-46.
115. Samuels P.B., Samuels B.M. & Webster D.R. (1952). New technics in the study of venous endothelium. *Lab. Invest.*, **1**: 50-60. En: *Staining Methods: histologic and histochemical*. Mc Manus J.F.A. & Mowry R.W. ed. Hoeber P.B. Ed. Medical Division of Harper & Brothers, 1960.
116. López-Vancell, R., Beaty, G., Stefani, E., Rodríguez-Boulán, E. & Cereijido, M. (1984). Changes in paracellular and cellular ionic permeabilities of monolayers of MDCK cells infected with viruses that bud from apical (influenza) or from basolateral (vesicular stomatitis) regions of the plasma membrane. *J. Membr. Biol.*, **81**:171-180.
117. González-Mariscal L., Borboa L., López-Vancell R., Beaty G. & Cereijido M. Electrical properties of MDCK cells. En: *Tissue Culture of Epithelial Cells*. ed. Mary Taub. Ed. Plenum Press, N. Y., 1985.
118. Haque R., Mollah N.U., Ali I.K.M., Alam K., Eubanks A., Lysterly D. & Petri W.A. Jr. (2000). Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *E. histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J. Clin. Microbiol.*, **38**: 3235-3239.
119. Spector D.L., Goldman R.D. & Leinwand L.A. *Cells*. Vol. 1: Culture and Biochemical Analysis of Cells. p 57.5- 57-9. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. 1988.
120. Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
121. Edman P. & Begg A. (1967). A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.*, **1**: 80-

91.

122. Petri W.A. & Schnaar R.L. (1995). Purification and characterization of galactose- and N-acetylgalactosamine-specific adhesin lectin of *Entamoeba histolytica*. *Meth. Enzymol.*, **253**: 98-104.
123. Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 4350-4354.
124. Pérez-Montfort, R., Ostoa-Soloma, P., Velázquez-Medina, L., Montfort, I. & Becker, I. (1987). Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **26**: 87-98.
125. Vargas Villarreal J., Martín-Polo J.J., Reynaud E. & Alagón-Cano A. (1991). A new affinity adsorbent for the purification of phospholipases A1 and A2 from animal venoms. *Toxicon*, **29**: 119-124.
126. Ravdin J.I., Petri W.A. Jr. & Mirelman D. Mechanisms of adherence of *Entamoeba histolytica*. En: Ravdin J.I. (ed) Amebiasis. Human Infection by *Entamoeba histolytica*, pp 205-218. John Wiley and Sons, New York, 1988.
127. Arroyo R. & Orozco M.E. (1987). Localization and identification of an *E. histolytica* adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **23**: 151-158.
128. Meza I., Cazares F., Rosales-Encina J.L., Talamás-Rohana P. & Rojkind M. (1987). Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.*, **156**: 798-805.
129. Li E., Stenson W.F., Kunz-Jenkins C., Swanson P.E., Duncan R. & Stanley S.L. (1994). *Entamoeba histolytica* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *Infect. Immun.*, **62**: 5112-5119.
130. Blaheta R.A., Hailer N.P., Brude N., Wittig B., Oppermann E., Leckel K., Harder S., Scholz M., Weber S., Encke A. & Markus B.H. (1998). Novel mode of action of the calcium antagonist mibefradil (Ro 40-5967): potent

- immunosuppression by inhibition of T-cell infiltration through allogeneic endothelium. *Immunol.*, **94**: 213-220.
131. Boettner D.R., Huston C. & Petri, W.A. (2002). Galactose/N-acetylgalactosamine lectin: the coordinator of host cell killing. *J. Biosci.*, **27**: 553-557.
 132. Tannich E., Ebert F. & Horstmann R.D. (1992). Molecular cloning of cDNA and genomic sequences coding for the 35 kilodalton subunit of the galactose-inhibitable lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **55**: 225-228.
 133. Hughes M., Lee C.W., Holm C.F., Ghosh S., Mills A., Lockhart L.A., Reed S.L. & Mann B.J. (2003). Identification of *Entamoeba histolytica* thiol-specific antioxidant as a GalNAc lectin-associated protein. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **127**: 113-120.
 134. McCoy J.J. & Mann B.J. (2005). Proteomic analysis of Gal/GalNAc lectin-associated proteins in *Entamoeba histolytica*. *Experim. Parasitol.*, **110**: 220-225.
 135. Rawal S., Majumdar S., Dhawan V. & Vohra H. (2004). *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin depletes antioxidant defences of target epithelial cells. *Parasitol.*, **128**: 617-624.
 136. Scholze H. & Tannich E. (1994). Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Meth. Enzymol.*, **244**: 512-523.
 137. Wilcox D. & Mason R.W. (1992). Inhibition of cysteine proteinases in lysosomes and whole cells. *Biochem. J.*, **285**: 495-502.
 138. Stanley S.L., Huizenga H. & Li E. Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **50**: 127-138.

139. Carrero J.C., Díaz M.Y., Viveros M., Espinoza B., Acosta E. & Ortiz L. (1994). Human secretory immunoglobulin A anti-*Entamoeba histolytica* antibodies inhibit adherence of amebae to MDCK cells. *Infect. Immun.*, **62**: 764-767.
140. Loftus B. *et al.* (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, **433**: 865-868.

ORIGINAL PAPER

Rosario López-Vancell · Irmgard Montfort
Ruy Pérez-Tamayo

Galactose-specific adhesin and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*

Received: 8 June 1999 / Accepted: 21 July 1999

Abstract We examined the molecular mechanisms of the cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*, using the loss of transepithelial electrical resistance (TER) of monolayers of Madin-Darby canine-kidney (MDCK) cells on their incubation with axenic trophozoites of the HM1-IMSS strain. Such loss of TER occurs very early (in 2–5 min) and is caused by the opening of tight junctions and the detachment of cells. We used specific inhibitors for three of the four molecules currently accepted as being responsible for cytotoxicity: galactose-specific adhesin(s), phospholipase A, and cysteine proteinases. We also used inhibitors of calcium channels. Axenic trophozoites of *E. histolytica* strain HM1-IMSS were preincubated with the different inhibitors for 1 h prior to their coinoculation with MDCK-cell monolayers. The only inhibitor that effectively blocked the loss of TER caused by the parasite was galactose. We suggest that in this experimental model, galactose-specific adhesin(s) are essential for amebic cytotoxicity.

Introduction

The molecular mechanisms of virulence of pathogenic *Entamoeba histolytica* remain poorly understood (Ackers 1996). In studies using a wide variety of in vitro and in vivo experimental models, at least five different types of molecules have been suggested to be responsible for the various types of cell and tissue damage caused by

pathogenic amebas, including (1) adhesins (McCoy et al. 1994; Petri et al. 1987; Rodríguez et al. 1989; Rosales-Encina et al. 1987), (2) amebapores (Leippe 1997; Leippe and Müller-Eberhard 1994; Leippe et al. 1991, 1994), (3) phospholipase A (Long-Krug et al. 1985; Ravdin et al. 1985; Vargas-Villarreal et al. 1995), (4) collagenase (Muñoz et al. 1982, 1984), and (5) cysteine proteinases (Becker et al. 1988; Keene et al. 1990; Montfort et al. 1993; Reed et al. 1989). In addition, it has been claimed that in early experimental amebic liver abscesses (Tsutsumi and Martínez-Palomo 1988; Tsutsumi et al. 1984) as well as in early experimental amebic intestinal lesions in hamsters and guinea pigs (Martínez-Palomo et al. 1989), polymorphonuclear leukocytes that come into contact with trophozoites die and disintegrate, releasing lysosomal enzymes that contribute to tissue damage. However, more recent evidence obtained in mice made leukopenic with monoclonal antibody RB6-8C5 (Rivero-Nava et al. 1997; Velázquez et al. 1997) suggests that trophozoites are quite capable of producing lesions in the absence of inflammatory cells. Of course, tissue damage caused in vivo by virulent amebic trophozoites involves the disruption and degradation of many different cellular and intercellular structures (Pérez-Tamayo 1986), which probably requires the simultaneous or consecutive action of several, or even many different, amebic molecules.

In this paper we report on an attempt to examine the role of four of the five molecular mechanisms of virulence currently considered for *E. histolytica*. We excluded collagenase from this study because in our experimental model there is no extracellular component. We used the earliest cellular lesion quantitatively described in vitro, namely, the decrease occurring in the transepithelial electrical resistance (TER) of epithelial cell monolayers when they come into contact with axenic trophozoites. This lesion is reported to be detectable just 2 min after coinoculation (Martínez-Palomo et al. 1985). Our results indicate that in this experimental model the one molecule responsible for the initiation of the cytotoxic effect of *E. histolytica* is the galactose-specific adhesin.

R. López-Vancell · I. Montfort · R. Pérez-Tamayo
Departamento de Medicina Experimental,
Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de
México y Hospital General de México,
06720 México, D.F., México

R. Pérez-Tamayo (✉)
Departamento de Medicina Experimental,
Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria,
Apartado Postal 70-641, 04510 México, D.F., México
e-mail: ruypt@hotmail.com, Fax: +52-761-0249

Materials and methods

Axenic cultures of *Entamoeba histolytica*

Trophozoites of *E. histolytica* strain HM1-IMSS were axenically cultured in TYI-S-33 medium (Diamond et al. 1978) at 37 °C in the absence of CO₂ for 72 h prior to harvesting. For the maintenance of a high degree of virulence, 25 × 10⁴ amebic trophozoites were injected intraportally into anesthetized hamsters every 2 weeks; after 7 days the animals were euthanized and amebas were recovered in culture from the liver abscesses.

Monolayers of Madin-Darby canine-kidney cells

Starter cultures of Madin-Darby canine-kidney (MDCK) cells were purchased from In Vitro, S.A., México (catalog number LC-12) and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, catalog number 31600-034) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, catalog number 26140-079), penicillin at 100 U/ml, and streptomycin at 100 µg/ml (Microlab, catalog number MC-110). Monolayers were formed by plating of cells at high densities (5 × 10⁵ cells/cm²) on previously sterilized 45-µm Millipore filters (catalog number HAW PO1300; Cerejido et al. 1978, 1980).

Measurement of TER

Damage to the MDCK-cell monolayers was assessed by the measurement of changes in TER at various times after the addition of amebic trophozoites (usually at a 5:1 cell:ameba ratio) on an Using chamber. Each monolayer grown on a filter was mounted between two Lucite chambers filled with DMEM, and the voltage deflection produced by the passage of 20 µA/cm² was detected by Ag/AgCl electrodes connected to a Keithley 6000 electrometer and was used to calculate TER values. The contributions of the empty filter, solutions, and electrodes were subtracted (Cerejido et al. 1978, 1980; González-Mariscal et al. 1985). Prior to its coinubation with amebic trophozoites, the cell monolayer's DMEM was replaced with TYI-S-33 medium. As preliminary observations confirmed that significant changes in TER became apparent quite early after the addition of amebic trophozoites to the MDCK monolayer, the cutoff time was set at 30 min.

Inhibitors of virulence molecules

After standardization of the cell-damage assay, preliminary experiments suggested the convenience of preincubation of the amebic trophozoites for 1 h with inhibitors of three of the four virulence molecules mentioned above and of Ca²⁺ channels (Table 1) before the initiation of their coinubation with the MDCK monolayers. In some cases the general conditions of coinubation were slightly modified to suit the solubility requirements of the inhibitor used. Trypan blue exclusion of amebas after preincubation with the inhibitors and prior coinubation with MDCK monolayers revealed >95% viability. Controls were run in

the absence of amebic trophozoites for establishment of the basal level of TER for each set of experiments. Controls of the osmolarity of the medium containing galactose were run using glucose, lactose, and mannose. The ability of the culture medium supplemented with E-64 or Rosenthal reagent to inhibit cysteine protease and phospholipase activity, respectively, was also tested in vitro. A minimum of six separate MDCK monolayers were run for each experiment. Results were expressed as the average percentage of decrease from the basal TER level plus the standard deviation. Student's *t*-test was used for statistical analysis of the results, with significance being fixed at *P* < 0.05.

Staining of the MDCK monolayers

Experiments identical to those described above were also performed using MDCK monolayers grown on previously sterilized glass coverslips (Superior, W.G. number 1, 18 mm). At 5 min before completion of the coinubation period the cell monolayers were placed on ice for the removal of amebas, fixed in 3.7% formaldehyde (pH 7.4) for 18 h, and stained with 0.4% silver nitrate for 1 min (McManus and Mowry 1960). The coverslips were counterstained with hematoxylin and mounted in synthetic resin for light microscopy.

Results

Figure 1 summarizes the general results of the TER measurements. Under the conditions standardized for our experiments the TER value was usually >10% of the control level at 30 min after coinubation of MDCK monolayers with axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica*. Of the various virulence-factor inhibitors used, the only one that completely blocked the ameba-induced loss of TER in MDCK-cell monolayers was galactose. The mixture of all inhibitors except galactose also failed to block significantly the loss of TER. Figure 2 shows that the inhibitory effect of galactose is dose-dependent and that for a constant number of amebic trophozoites there is a saturation point. Controls of the effect of osmolarity with glucose and mannose were negative, whereas lactose also inhibited the drop in TER to the same (or an even lower) level as did galactose (data not shown).

Figure 3 illustrates the light-microscopy features of the MDCK monolayers. The control monolayer shows irregular epithelial cells tightly joined to each other, with no space being visible between them. After coinubation for 30 min with amebic trophozoites there were either small clefts or larger gaps or holes separating them (depending on the MDCK-cell:ameba ratio), usually in the close vicinity of amebas. Figure 3 also illustrates that in the presence of galactose plus amebic trophozoites the MDCK monolayer is indistinguishable from the control, not only in the complete lack of intercellular separations but also in the absence of amebas, which fail to adhere to the monolayer.

Discussion

In a classic study, Martínez-Palomo et al. (1985) introduced the loss of TER in MDCK monolayers induced

Table 1 Virulence factors and inhibitors studied

Virulence factor	Inhibitor
Cysteine proteinase(s)	α-2-Macroglobulin (3.0 mg/ml) E-64 (10 ⁻⁴ M)
Phospholipase A	Rosenthal (10 ⁻³ M)
Calcium channels	Verapamil (10 ⁻⁴ M) Bepiridil (10 ⁻⁵ M)
Galactose-specific adhesin(s)	Galactose (180 mM)

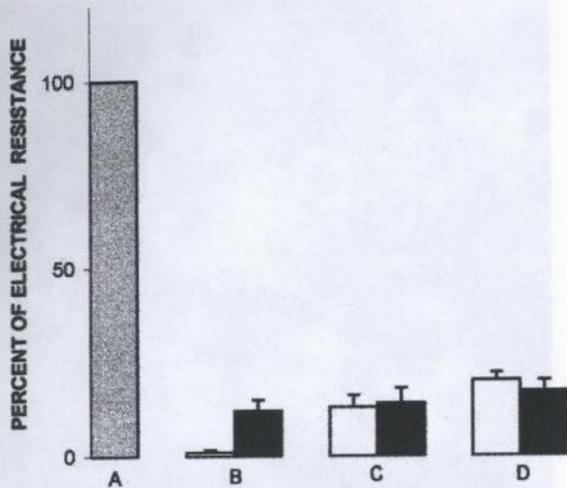


Fig. 1 Effect of inhibitors on TER decreases produced by *Entamoeba histolytica*. The TER value recorded for MDCK monolayers incubated for 30 min with TYI medium + inhibitor (A) was considered the 100% control value for each set of experiments. White bars represent monolayers incubated with *E. histolytica* strain HM1-IMSS for 30 min, and black bars represent monolayers incubated with *E. histolytica* strain HM1-IMSS pretreated for 1 h with α-2-macroglobulin at 3.0 mg/ml (B), E-64 at 10⁻⁴ M (C), Rosenthal inhibitor at 10⁻³ M (D), verapamil at 10⁻⁴ M (E), bepridil at 10⁻⁵ M (F), galactose at 180 mM (G), and all inhibitors except galactose (H)

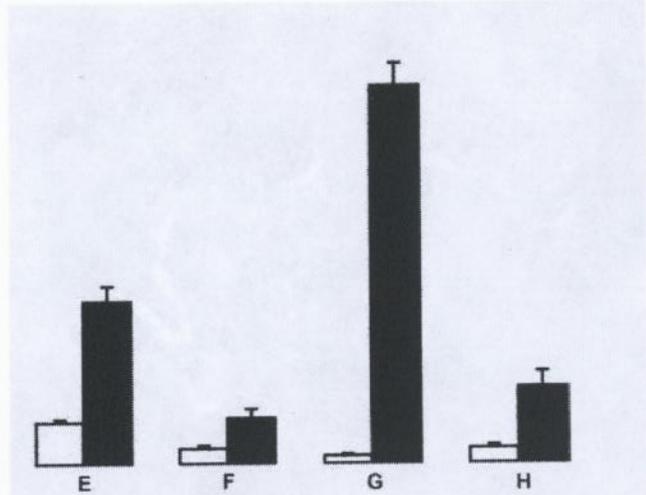


Fig. 2 Effect of different galactose concentrations on the TER of MDCK-cell monolayers incubated for 30 min with *E. histolytica* strain HM1-IMSS pretreated for 1 h with different concentrations of galactose. The ameba:cell ratio was 1:5. Each point represents the mean value recorded for at least seven monolayers

by coincubation with axenic trophozoites of virulent *Entamoeba histolytica* as a useful tool for study of the cytolytic mechanisms of the parasite. The technique has three distinct advantages over many others that have been used for the same purpose: it is quantitative, it explores the earliest detectable cytotoxic effect of pathogenic amebas (2 min), and it is reasonably inexpensive. Although the technique has not been used as widely as it deserves, Li et al. (1994) recently reported on a careful study with polarized human intestinal Caco-2 cell monolayers, in which they showed that a decrease in the temperature to 4 °C or the addition of cytochalasin D inhibited the decrease in TER caused by coincubation with amebic trophozoites, but in contrast to our findings, lactose failed to affect the same decrease in TER.

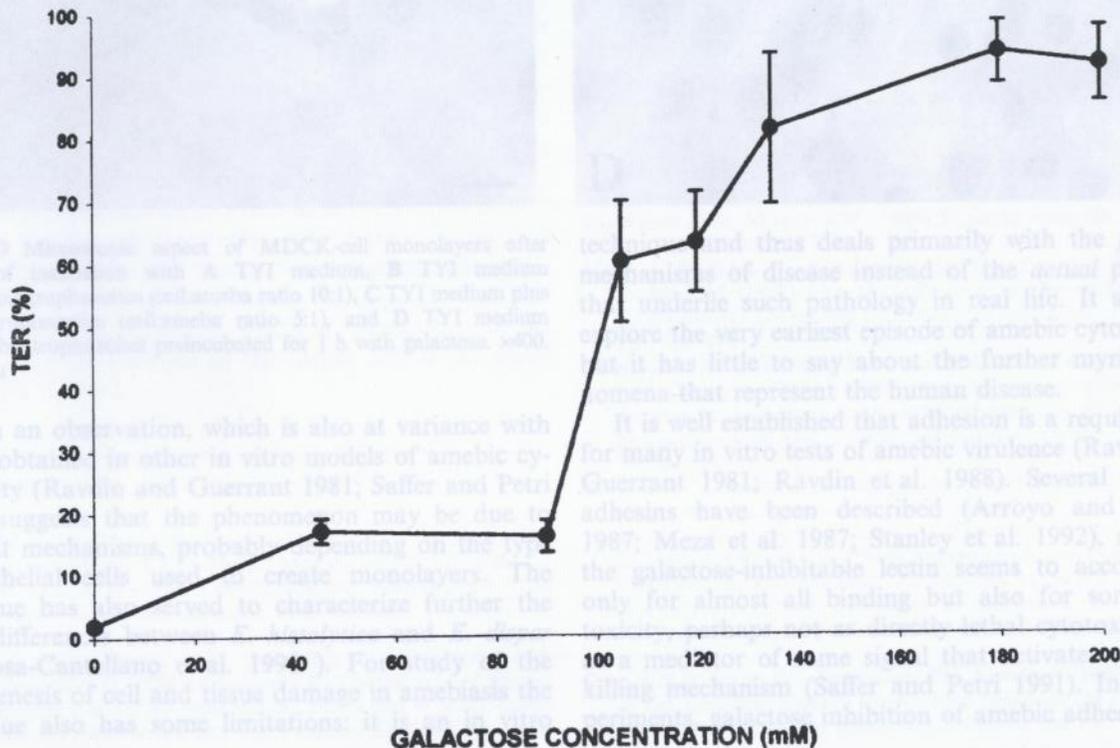


Fig. 3 Effect of galactose concentration on the TER of MDCK-cell monolayers after 30 min of incubation with A TYI medium, B TYI medium plus amebic trophozoites (amoeba:cell ratio 10:1), C TYI medium plus amebic trophozoites (amoeba:cell ratio 5:1), and D TYI medium plus amebic trophozoites preincubated for 1 h with galactose. ×400. (Reprinted from [1994], p. 100.)

Such an observation, which is also at variance with results obtained in other in vitro models of amebic cytotoxicity (Raydin and Guerrant 1981; Saffer and Petri 1991), suggests that the phenomenon may be due to different mechanisms, probably depending on the type of epithelial cells used to create monolayers. The technique has been used to characterize further the cytotoxicity of *E. histolytica* (Espinosa-Carrilano et al. 1994). For the study of the pathogenesis of cell and tissue damage in amebiasis the technique also has some limitations: it

and thus deals primarily with the potential mechanisms of disease instead of the actual processes that underlie such pathology in real life. It serves to explore the very earliest episode of amebic cytotoxicity, but it has little to say about the further myriad phenomena that represent the human disease.

It is well established that adhesion is a required step for many in vitro tests of amebic virulence (Raydin and Guerrant 1981; Raydin et al. 1988). Several different adhesins have been described (Arroyo and Orozco 1987; Meza et al. 1987; Stanley et al. 1992), although the galactose-inhibitable lectin seems to account not only for almost all binding but also for some cytotoxicity but not for all cytotoxicity. The lectin is a specific killing mechanism (Saffer and Petri 1991). In our experiments galactose inhibition of amebic adhesion also

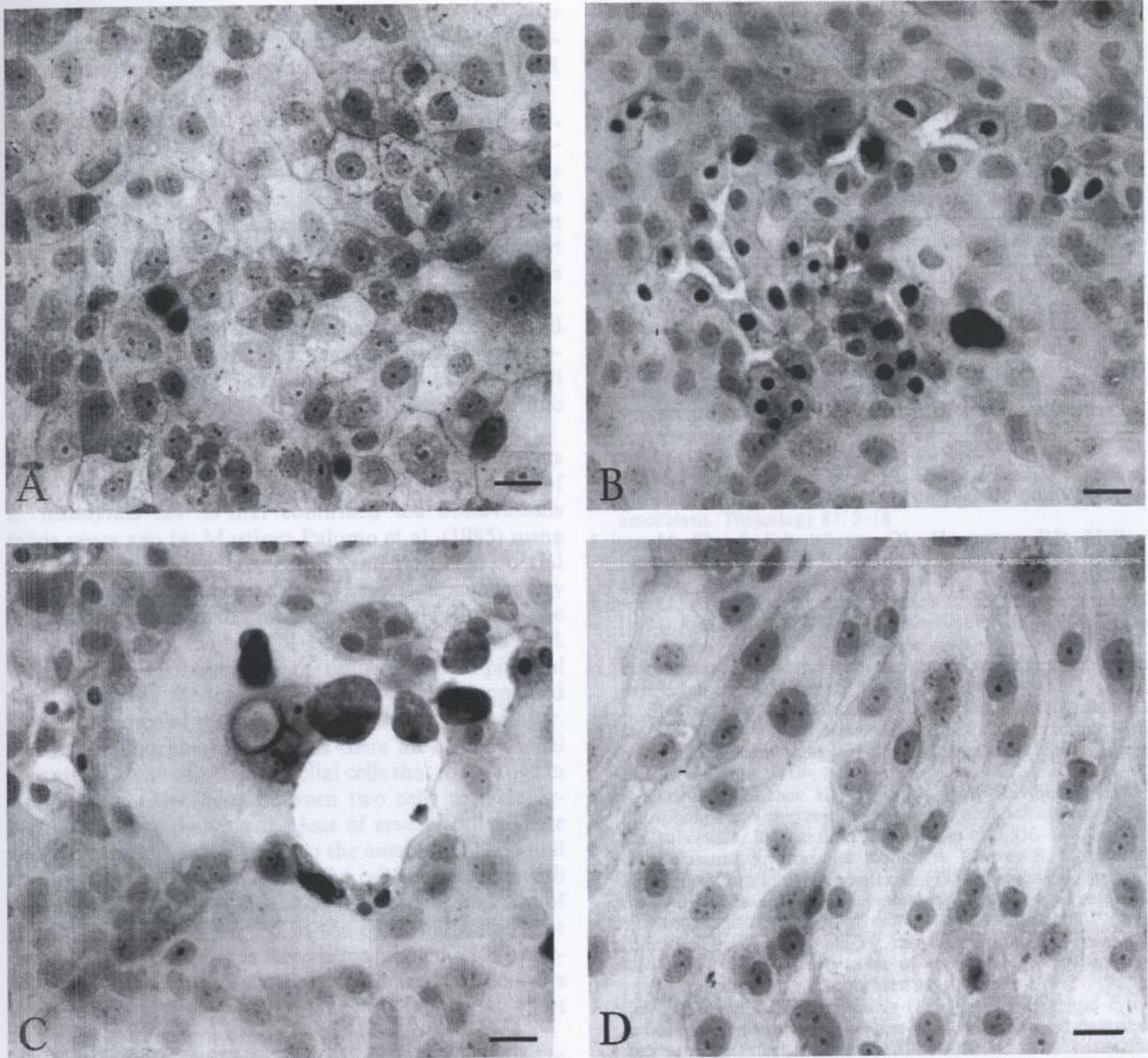


Fig. 3A-D Microscopic aspect of MDCK-cell monolayers after 30 min of incubation with A TYI medium, B TYI medium plus amebic trophozoites (cell:ameba ratio 10:1), C TYI medium plus amebic trophozoites (cell:ameba ratio 5:1), and D TYI medium plus amebic trophozoites preincubated for 1 h with galactose. $\times 400$. Bar 160 μ .

Such an observation, which is also at variance with results obtained in other in vitro models of amebic cytotoxicity (Ravdin and Guerrant 1981; Saffer and Petri 1991), suggests that the phenomenon may be due to different mechanisms, probably depending on the type of epithelial cells used to create monolayers. The technique has also served to characterize further the many differences between *E. histolytica* and *E. dispar* (Espinosa-Cantellano et al. 1998). For study of the pathogenesis of cell and tissue damage in amebiasis the technique also has some limitations: it is an in vitro

technique and thus deals primarily with the *potential* mechanisms of disease instead of the *actual* processes that underlie such pathology in real life. It serves to explore the very earliest episode of amebic cytotoxicity, but it has little to say about the further myriad phenomena that represent the human disease.

It is well established that adhesion is a required step for many in vitro tests of amebic virulence (Ravdin and Guerrant 1981; Ravdin et al. 1988). Several different adhesins have been described (Arroyo and Orozco 1987; Meza et al. 1987; Stanley et al. 1992), although the galactose-inhibitable lectin seems to account not only for almost all binding but also for some cytotoxicity, perhaps not as directly lethal cytotoxicity but as a mediator of some signal that activates a specific killing mechanism (Saffer and Petri 1991). In our experiments, galactose inhibition of amebic adhesion also

blocked cytotoxicity, whereas inhibitors of the other molecules associated with amebic virulence, either singly or combined, had no effect on the drop in TER induced by *E. histolytica*.

Amebic cytotoxicity may be a multifactorial effect, and adhesion of amebas to the target cell may be necessary for the participation of all the other molecules involved in cell damage, but, then, at least some degree of inhibition of the decrease in TER should have been observed in our experiments when adhesion was allowed to occur between MDCK-cell monolayers and amebas that had previously been treated with the various inhibitors other than galactose. We have not directly ruled out the possible role of the amebapore in this phenomenon, but the absence of effect in the presence of all inhibitors except galactose (or lactose) suggests that the amebapore is not involved.

Microscopic examination of the MDCK monolayers after their coincubation with axenic trophozoites of *E. histolytica* for 30 min confirmed the observations made years ago by Martínez Palomo et al. (1985) using time-lapse microcinematography and transmission and scanning electron microscopy. There is a satisfactory correlation between the measurement of TER and the physical status of the MDCK-cell monolayer; high TER readings are characteristic of uninterrupted epithelial sheets, whereas the loss of TER is always accompanied by the presence of discontinuities in the cell monolayer. In the neighborhood of amebas there are usually focal separations between the epithelial cells that may range in size from narrow clefts between two cells to wide, irregular spaces involving the loss of several cells. There was a clear correlation between the ameba:cell ratio and the severity of the damage to the cell monolayer; with higher numbers of trophozoites, the number and size of the empty spaces observed in the epithelial monolayer increased. When amebas were preincubated with galactose and then added to the MDCK-cell monolayers there was no loss in TER and the epithelial sheet remained microscopically intact.

Thus, of the many factors that have been implicated in the early in vitro cytotoxic effect of *E. histolytica*, such as motility, phagocytosis, "toxins," amebapores, phospholipases, and cysteine proteinases, it appears that the galactose-inhibitable lectin, which is responsible for the adhesion of the parasite to the target cell, is the more important element.

References

Ackers JP (1996) The invasiveness of *Entamoeba histolytica* – a continuing enigma. *J Clin Pathol Mol Pathol* 49: 192–198
 Arroyo R, Orozco E (1987) Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol* 23: 151–158
 Becker I, Pérez-Tamayo R, Montfort I, Alvizouri AM, Pérez-Montfort R (1988) *Entamoeba histolytica*: role of amebic proteinases and polymorphonuclear leukocytes in acute experimental amebiasis in the rat. *Exp Parasitol* 67: 268–280

Cerejido M, Robbins ES, Dolan WJ, Rotunno CA, Sabatini DD (1978) Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol* 77: 853–880
 Cerejido M, Stefani E, Martínez-Palomo A (1980) Occluding junctions in a cultured transporting epithelium: structural and functional heterogeneity. *J Membr Biol* 53: 19–32
 Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72: 431–432
 Espinosa-Cantellano M, González-Robles A, Chávez B, Castañón G, Argüello C, Lázaro-Haller A, Martínez-Palomo A (1998) *Entamoeba dispar*: ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. *J Eukaryote Microbiol* 45: 265–272
 González-Mariscal L, Borboa L, López-Vancell R, Beaty G, Cerejido M (1985) Electrical properties of MDCK cells. In: Taub M (ed) *Tissue culture of epithelial cells*. Plenum, New York, pp 25–36
 Keene WE, Hidalgo ME, Orozco E, McKerrow JH (1990) *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp Parasitol* 71: 199–206
 Leippe M (1997) Amebapores. *Parasitol Today* 13: 178–183
 Leippe M, Müller-Eberhard HJ (1994) The pore forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicology* 87: 5–18
 Leippe M, Ebel S, Schoenberger OL, Horstmann RD, Müller-Eberhard HJ (1991) Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7659–7663
 Leippe M, Andrä J, Nickel R, Tannich E, Müller-Eberhard HJ (1994) Amebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol Microbiol* 14: 895–904
 Li E, Stenson WF, Kunz-Jenkins C, Swanson PE, Duncan R, Stanley SL Jr (1994) *Entamoeba histolytica* interaction with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *Infect Immun* 62: 5112–5119
 Long-Krug SA, Fischer KJ, Hysmith RM, Ravdin JI (1985) Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. *J Infect Dis* 152: 536–541
 Martínez-Palomo A, González Robles A, Chávez B, Orozco E, Fernández-Castelo S, Cervantes A (1985) Structural bases of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Protozool* 32: 166–175
 Martínez-Palomo A, Tsutsumi V, Anaya-Velázquez F, González-Robles A (1989) Ultrastructure of experimental intestinal invasive amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 41: 273–279
 McCoy JJ, Mann BJ, Petri WA Jr (1994) Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. *Infect Immun* 62: 3045–3050
 McManus JFA, Mowry RW (1960) Staining methods: histologic and histochemical. Hoeber, New York, p 295
 Meza I, Cazares F, Rosales-Encina JL, Talamás-Rohana P, Rojkind M (1987) Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 156: 798–805
 Montfort I, Pérez-Tamayo R, González-Canto A, García de León MC, Olivos A, Tello E (1993) Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* in the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes in vitro. *J Parasitol* 79: 98–105
 Muñoz ML, Calderón J, Rojkind M (1982) The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 155: 42–51
 Muñoz ML, Rojkind M, Calderón J, Tanimoto M, Arias-Negrete S, Martínez-Palomo A (1984) *Entamoeba histolytica*: collagenolytic activity and virulence. *J Protozool* 31: 468–470
 Pérez-Tamayo R (1986) Pathology of amebiasis. In: Martínez-Palomo A (ed) *Amebiasis*. Elsevier Science, Amsterdam, pp 45–94
 Petri WA Jr, Smith RD, Schlesinger PH, Ravdin JI (1987) Isolation of the galactose-binding lectin which mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 80: 1238–1244

- Ravdin JI, Guerrant RL (1981) Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 68: 1305-1313
- Ravdin JI, Murphy CF, Guerrant RL, Long-Krug SA (1985) Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 152: 542-546
- Ravdin JI, Petri WA Jr, Mirelman D (1988) Mechanisms of adherence of *Entamoeba histolytica*. In: Ravdin JI (ed) Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. John Wiley and Sons, New York, pp 205-218
- Reed SL, Keene WE, McKerrow JH (1989) Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 27: 2772-2777
- Rivero Nava L, Aguirre García J, Calderón J (1997) Production of amebic intestinal lesions in BALB/c mice. *Arch Med Res [Suppl]* 28: 220-222
- Rodríguez MA, Hernández F, Santos L, Valdez A, Orozco E (1989) *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Mol Biochem Parasitol* 37: 87-100
- Rosales-Encina JL, Meza I, López de León A, Raimás-Rohana P, Rojkind M (1987) Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 156: 790-797
- Saffer LD, Petri WA Jr (1991) Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. *Infect Immun* 59: 4681-4683
- Stanley SL Jr, Huiyenga H, Li E (1992) Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 50: 127-138
- Tsutsumi V, Martínez-Palomo A (1988) Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. *Am J Pathol* 130: 112-119
- Tsutsumi V, Mena-López R, Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A (1984) Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 117: 81-91
- Vargas-Villarreal J, Martínez-Rodríguez H, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, Said-Fernández S (1995) Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and lysophospholipase L₁ activities. *Parasitol Res* 81: 320-323
- Velázquez C, Tsutsumi V, Shibayama Salas M, Aguirre García J, Calderón J (1997) Role of the neutrophil in the pathogenesis of the amebic liver lesion in mice. *Arch Med Res [Suppl]* 28: 230-232