

14
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

OBTENCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA
Entamoeba histolytica E IgG HUMANA ACOPLADOS
A UN MARCADOR

FALLA DE ORIGEN

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
ALEJANDRO ESTRADA FLORES

DIRECTORES DE TESIS: DR JESUS CALDERON TINOCO
O. F. B IDALIA AVILA MIYAZAWA



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 está 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

	HOJA No.
RESUMEN	18
INDICE DE TABLAS	211
INDICE DE FIGURAS.....	211
GLOSARIO DE TERMINOS	291
I. -INTRODUCCION Y JUSTIFICACION DEL PROYECTO.....	1
II. -GENERALIDADES	9
INMUNOGLOBULINAS.....	9
AMIBLASTOS	13
INTERFERONES.....	30
LUPUS ERYTEMATOSO SISTEMICO.....	32
III. -OBJETIVOS.....	41
IV. -MATERIAL Y METODOS.....	43
DIAGRAMA DE FLUJO	44
IV.1. -ANTICUERPO DE CONEJO ANTI <i>E. histolytica</i>.....	45
IV.1.1. -OBTENCION DEL ANTICUERPO Y ACOPLAMIENTO A UN MARCADOR.....	45
IV.1.2. -ELIMINACION DE NESPECIFICIDADES EN EL Ac DE CONEJO ANTI <i>E. histolytica</i> Y PRUEBA DE SU ACTIVIDAD.....	58
IV.2. -ANTICUERPO DE CABRERO ANTI IgG HUMANA.....	53
IV.2.1. -OBTENCION DEL ANTICUERPO Y ACOPLAMIENTO A MARCADORES	53
IV.2.2. -ELIMINACION DE POSEIBLES NESPECIFICIDADES EN LOS ANTICUERPOS Y PRUEBA DE SU	

ACTIVIDAD	71
IV.3. -TRATAMIENTO ESTADISTICO	77
IV.3.1. -MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL Y DE DISPERSION	77
IV.3.2. -INFERENCIA ESTADISTICA	77
V. -RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	81
V.1. -ANTICUERPO DE CONEJO ANTI β <i>Asiolytica</i>	82
V.2. -ANTICUERPO DE CARNERO ANTI β HUMANA	92
VI. -DISCUSION	111
VI.1. -SISTEMA DE DETECCION DE AG DE AMIBA CIRCULANTE EN EL SUERO DE PACIENTES CON ASA	114
VI.2. -ESPECIFICIDAD DE RN AG CONTRA EL RECEPTOR DE INF γ EN EL SUERO DE PACIENTES CON LES	121
PERSPECTIVAS	133
VII. -CONCLUSIONES	135
VIII. -APENDICES	137
APENDICE A. -MICROMETODO DE DETERMINACION DE PROTEINAS	139
APENDICE B. -PRUEBA RAPIDA DE DETECCION DE PROTEINAS POST-ELECCION EN COLUMNA POR EL METODO DE BCA	143
APENDICE C. -PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL DESARROLLO DEL ANALISIS ENMOENZIMATICO EN FASE SOLIDA (ELISA)	146
IX. -BIBLIOGRAFIA	148

RESUMEN

En este trabajo se desarrollaron procesos de inmunopurificación para dos anticuerpos, dada la gran importancia adquirida por estas proteínas en la inmunología, ya que anticuerpos específicos contra antígenos definidos son necesarios para la tipificación de los parásitos, análisis de la variabilidad antigénica, inmunización pasiva y para la comprensión de la inhibición de la infectividad de los parásitos *in vitro*.⁽²⁾

Por lo tanto, el objetivo principal del presente trabajo fue la obtención de dos anticuerpos que detectaran antígenos solubles de *Entamoeba histolytica* e IgG humana respectivamente de forma específica, y dado que si los anticuerpos son específicos y de gran título podrían ser usados en inmunoanálisis⁽³⁾, se desarrollaron dos sistemas para probar la actividad de estos anticuerpos.

Los dos inmunoensayos planteados para probar la actividad de estos reactivos fueron los siguientes:

Detección de antígeno amibiano circulante en el suero de pacientes con absceso hepático amibiano para el cual se usó el anticuerpo contra amiba; y el otro fue la *liberación de un anticuerpo contra el receptor de Phloretin* y en el suero de pacientes con *Lupus Eritematoso Sistémico*, en el cual se utilizó el anticuerpo contra IgG humana.

En base a estos objetivos el trabajo fue dividido en las siguientes dos partes:

1 - La primera relativa al método inmunológico de ELISA. - Para lo cual se siguieron los pasos deus a continuación en base al anticuerpo de que se trate:

A) Anticuerpo de origen anti *E. histolytica*

Este anticuerpo se inmunopurificó utilizando una columna de

sefarosa 4B la cual tenia acoplado extracto soluble de *E. histolytica* (Copa BM).

Una parte de este anticuerpo policonal inmunopurificado se marco con biotina y la parte restante se dejo sin marcar y se utilizo como anticuerpo de captura. Estos anticuerpos se aplicaron en un ELISA de emparedado; de esta manera la tecnica logro detectar hasta 0.3125 $\mu\text{g/ml}$ de extracto soluble de *E. histolytica*.

BD) Anticuerpo de carnero contra IgG humana.

Este anticuerpo, obtenido por inmunofinidad anteriormente¹⁰⁴, fue purificado utilizando una columna de sefarosa 4B la cual tenia acoplada IgG de ratón; este paso se realizo para de evitar posibles inespecificidades en el sistema ideado para su actividad, el cual consistio en un ELISA de doble emparedado, con un anticuerpo monoclonal de raton (GIR 208) como anticuerpo de captura (es decir, un anticuerpo que inmovilice y purifique el receptor de INF y en la placa de ELISA).

Una parte de este anticuerpo de carnero se marco con biotina y otra parte se marco con peroxidasa de rabano.

En base al titulo y a pruebas rigurosas de sensibilidad y especificidad se demostró que el marcaje mas idóneo fue la biotinilacion; el anticuerpo marcado con biotina dio una sensibilidad de 0.325 $\mu\text{g/ml}$ de IgG humana a una dilucion de 1/20 000 del anticuerpo y con una preincubación con suero normal de ratón a una dilución final de 1/30.

2.- La segunda fue el estudio de los grupos de pacientes y el grupo control en los inmunoensayos ideados para valorar la actividad de cada anticuerpo.

A) Detección de antígeno amibiano circulante en el suero de pacientes con absceso hepático amibiano. Para el caso del anticuerpo de conejo anti amiba.

El grupo problema consistio en 14 pacientes con absceso hepatico amibiano y el grupo control fueron los sueros de 10

personas clínicamente sanas.

Los resultados obtenidos, los cuales fueron las absorbancias promedio de cada grupo a una dilución única de 1/10, se analizaron por medio de una prueba de hipótesis, la cual sigue una distribución t de Student; esta prueba no demostró una diferencia significativa en estos dos grupos.

En este trabajo se discuten las posibles causas de la falla del sistema a pesar de las rigurosas pruebas de especificidad a las que fue sujeto, del mismo modo se proponen algunas estrategias con el fin de encontrar el sistema idoneo para la búsqueda de este antígeno.

Búsqueda de un anticuerpo contra el receptor de Interferon y en el suero de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. Para el caso del anticuerpo de conejo anti IgG humana marcado con biotina.

Este sistema se probó en el suero de 41 pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico y como grupo control 40 personas clínicamente sanas.

Los resultados obtenidos, los cuales consisten en la absorbancia obtenida de estos sueros a tres diluciones diferentes (1/50, 1/100, y 1/500), se analizaron mediante una prueba de hipótesis con una distribución t de Student, demostrándose una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de pacientes con una $p < 0.01$ a cualquiera de las tres diluciones ensayadas.

Se discute el posible papel etiológico de este anticuerpo en la enfermedad autoinmune LES. De igual manera se proponen experimentos confirmatorios de la presencia de este anticuerpo en el suero de los pacientes.

INDICE TABLAS

TABLA	NO. HOJA
1. -CARACTERISTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS.....	12
2. -TECNICAS PARA EL EXAMEN DE MUESTRAS PARA LA PRESENCIA DE PROTOZOARIOS INTESTINALES.....	21
3. -TECNICAS SEROLOGICAS EN AMIBIASIS.....	22
4. -PREVALENCIA GLOBAL E INCIDENCIA DE AMIBIASIS 1984.....	26
5. -CLASIFICACION DE INTERFERONES.....	30
6. -ALGUNOS EFECTOS DE LOS INTERFERONES EN LA FUNCION CELULAR	31
7. -PROTOCOLO DE UNION EN BUSQUEDA DE Ag AMIBIANO SERICO..	61
8. -PROTOCOLO DE UNION EN BUSQUEDA DE UN Ac vs RECEPTOR DE INF γ	74
9. -MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL Y DISPERSION EN EL ENSAYO DE BUSQUEDA DE Ag AMIBIANO CIRCULANTE.....	91
10. -ACTIVIDAD INESPECIFICA DE SUEROS HUMANOS NORMALES RECONOCIDOS POR EL Ac DE CARNERO ANTI IgG HUMANA BIOTINILADO.....	99
11. -MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL Y DISPERSION EN EL ENSAYO DE BUSQUEDA DE UN Ac CONTRA EL rINF γ	101
12. -REGLA DE DECISION.....	105
13. -ESTADISTICA DE PRUEBA CALCULADA LE_{α}	105
14. -ESTIMACION DE Ac CONTRA RECEPTOR DE INF γ	107
15. -INMUNOREACTIVOS: CARACTERISTICAS.....	113
16. -DETECCION DE ANTIGENO AMIBIANO: COMPARACION DE SISTEMAS.....	116

INDICE DE FIGURAS

Figura	No HOJA
1. -Respuesta inmune celular contra <i>Entamoeba histolytica</i> ...	20
2. -Sistema de enfriamiento para la activación de sacarosa-4B.....	49
3. -A) Activación de la sacarosa 4B estructura hipotética.....	51
B) Acoplamiento de proteína a sacarosa 4B: reacción.....	51
4. -Cromatografía de afinidad.....	53
5. -Protocolo para la detección de Ag amibiano circulante en pacientes con AHA.....	62
6. -Protocolo de identificación de la sensibilidad del anticuerpo de carnero anti IgG humana marcado con biotina.....	70
7. -Protocolo de búsqueda de un Ac contra rINF γ	76
8. -Grado de biotilación del Ac de conejo anti <i>E. histolytica</i> marcado con biotina en Dot Blot.....	83
9. -Título del Ac de conejo anti <i>E. histolytica</i> marcado con biotina.....	84
10. -Sensibilidad del Ac de conejo anti <i>E. histolytica</i> marcado con biotina.....	85

11. -A) Especificidades inmunes del Ac de conejo anti <i>E. histolytica</i> por inmunoblot.....	87
B) Curva patrón con marcadores de peso molecular.....	88
12. -A) Detección de Ag sbitiano circulante en el suero de pacientes con AHA.....	90
B) Detección de anticuerpos contra amiba circulantes en el suero de pacientes con AHA.....	90
13. -Grado de biotinilación del Ac de carnero anti IgG humana marcado con biotina en Dot Blot.....	94
14. -Título del Ac de carnero anti IgG humana marcado con peroxidasa.....	95
15. -Título del Ac de carnero anti IgG marcado con biotina.....	95
16. -Sensibilidad del Ac de carnero anti IgG humana marcado con biotina.....	97
17. -Reacciones inespecíficas del Ac de carnero anti IgG humana marcado con biotina.....	100
18. -Búsqueda de un Ac contra el receptor de INF γ en el suero de pacientes con LES.....	103
19. -Carta control de Shewhart.....	110
20. -Determinación de proteínas por el método de BCA.....	139
21. -Determinación de Proteínas por el método de Folin.....	141

GLOSARIO DE TERMINOS

- ABTS .-Acido 2,2',azino bis (3-etilbenzotiazolina)-8-sulfónico.
- Ac. -Anticuerpo.
- Ac's. -Anticuerpos.
- Ag. -Antígeno.
- AHA. -Absceso Hepatico Amibiano.
- ASF. -Amortiguador de fosfatos 15 mM, NaCl 150 mM. pH=7.2 (también llamado PBS por sus siglas en inglés)
- B. -Biotina.
- BCA. -Acido Bicinconínico.
- CIC. -Complejos Inmunes Circulantes.
- Con A. -Concanavalina A.
- DAB. -Diamino Benzidina.
- Dot Blot. -ELISA en papel de nitrocelulosa como fase sólida (siglas en inglés)
- ELISA. -Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida (siglas en Inglés)

E. hist. -Entamoeba histolytica.

MHC. -Complejo principal de Histo compatibilidad.

Ig. -Inmunoglobulina

IgG. -Inmunoglobulina G

INF γ . -Interferon Gamma

Immublot. -Deteccion por inmunoensayo de proteinas adsorbidas electrostáticamente a papel de nitrocelulosa.

kDa. -Kilodaltons = 1000 daltons.

L_B. -Linfocito B

LES. -Lupus Eritematoso Sistémico.

L_T. -Linfocito T

μ g. -Microgramos.

μ l. -Microlitros.

ng. -Nanogramos.

PM. -Peso molecular.

Po. -Peroxidasa.

rINF γ . -Receptor de Interferon Gamma.

I

INTRODUCCION

JUSTIFICACION
DEL PROYECTO

I.-INTRODUCCION

Es ampliamente conocido que la inmunología como disciplina tiene una rama muy importante orientada hacia la producción de anticuerpos. ²⁰Esta idea, la de usar proteínas como con las globulinas acarreadoras, lo bien anticuerpos (Elms 1960, Yalow y Barson 1960) ¹ como agentes de ensayo, fue descrita alrededor de 1960. ¹²

Esto nos permite vislumbrar la importancia referida al uso de los anticuerpos como reactivos biológicos en esta disciplina.

Es así, anticuerpos específicos contra antígenos definidos son necesarios para la identificación de varios parásitos, análisis de la variabilidad antigénica, inmunización pasiva o para comprender la inhibición de la infectividad de los parásitos in vitro.

Sin anticuerpos o antígenos definidos, poco progreso real puede esperarse en el análisis de aspectos inmunológicos. ²⁰

El principal objetivo del presente trabajo fue la producción de dos anticuerpos específicos para su uso en inmunoanálisis y dado que cuando los anticuerpos son específicos y título elevado se pueden usar inmunoanálisis ¹², se desarrollaron 2 sistemas que involucran a estos dos reactivos con el fin de evaluar su título y especificidad.

II.-JUSTIFICACION DEL PROYECTO

Actualmente los inmunoanálisis que han recibido mayor auge son los siguientes:

Los radioinmunoensayos, los cuales tienen una sensibilidad muy grande.

Los de inmunofluorescencia, generalmente usados en Microbiología y Patología para la medición de anticuerpos y antígenos muy particulares.

¹ Mencionado en ref. 20

Y los inmunoensayos enzimáticos, que en fechas recientes han sobrepasado en cuanto a su uso a los inmunoensayos precedentes por amplio margen. (12 y 13)

El que los inmunoensayos enzimáticos estén ganando tal importancia puede deberse a los siguientes puntos:

Los radioinmunoensayos tienen los inconvenientes de producir un ambiente peligroso, la vida media tan corta de los isótopos usados (usualmente I^{125}) para unir problemas administrativos basados en la legislación (debido a posibles riesgos de salud); estos inconvenientes han hecho que estos ensayos sean generalmente confinados a los experimentos endocrinológicos. Esto también ha obligado a que se desarrollen productos no radioactivos para observar los puntos finales de estos ensayos. (12 y 13)

En el caso de los reactivos fluorescentes se ha incrementado su uso por medio de los anticuerpos monoclonales para la detección de microorganismos en muestras clínicas. Su uso está muy limitado por tener aplicaciones muy particulares y la necesidad de un personal ampliamente capacitado en su uso, lo cual contrasta con los inmunoensayos enzimáticos. (13)

El estudio de los inmunoensayos enzimáticos ha llevado al desarrollo del inmunoensayo con enzima ligada en una fase sólida o ELISA (por sus siglas en inglés).

Este inmunoensayo tiene reactivos de largas vidas medias, es libre de legislaciones limitantes, es adaptable a sistemas simples, así como complicadas automatizaciones; además de la gran variedad de sistemas de detección con rangos que van desde el visual al fotométrico, desde cromógenos hasta agentes luminiscentes o fluorescentes, lo cual ha contribuido a la gran expansión del ELISA y de su aplicación durante los últimos años. (13 y 12)

Por estas razones nos hemos orientado hacia el uso del ELISA en los inmunoensayos precedentes.

Ahora bien, una vez obtenidos los reactivos específicos antes mencionados será menester probarlos en un inmunoensayo para su actividad.

En este trabajo se plantean 2 inmunoensayos para estos reactivos: Uno es el de "Detección de anticuerpo anti-*Amiba* circulante en el suero de pacientes con absceso hepático *amibiano*", el otro es "Detección de un anticuerpo contra el receptor de INF γ y en el suero de pacientes con *Síndrome Sistémico Lúpico*". para el primer inmunoensayo se utilizará el anticuerpo de conejo anti *Entamoeba histolytica* cepa HMI, ya sea marcado y/o sin marcar con Biotina y para el segundo inmunoensayo se usará el anticuerpo de carnero anti IgG de humano marcado con Peroxidasa.

Por lo consiguiente consideramos necesario un breve esbozo del problema que plantea la amibiasis y de algunos aspectos generales acerca del Lupus Eritematoso Sistémico.

De igual manera se hará el listado de algunos datos reportados en la literatura que nos dieron la base para idear estos inmunoensayos.

La amibiasis ocurre en todo el mundo. Una estimación de 1988 indica que 480 millones de personas acarrean *E. histolytica* en su tracto intestinal, un 10% del total (48 millones) anualmente tienen una invasión en su mucosa intestinal o bien ya en el hígado. (70)

El diagnóstico es ayudado principalmente por la observación de la amiba en muestras ya sea directamente, por técnicas de tinción o bien por técnicas de concentración, pero el serodiagnóstico es una herramienta de mayor peso para la Inmunología. (71)

En el pasado el serodiagnóstico de los abscesos hepáticos amibianos estaba basado en la detección de anticuerpos circulantes contra *Entamoeba histolytica* en la sangre. (72,73)

Esta determinación está perdiendo su valor diagnóstico ya que se ha comprobado que los anticuerpos contra amiba son regularmente producidos en amibiasis asintomática e invasiva. Esto tiene la desventaja de que también se producen con frecuencia variables en pacientes asintomáticos, además de que el encontrar estos anticuerpos no tiene correlación con el estado clínico, la intensidad de la infección y es más, los anticuerpos pueden estar ausentes en pacientes recientemente infectados. (70,10,00)

La demostración de anticuerpos contra amiba no puede diferenciar tan fácilmente una infección presente y una pasada, especialmente cuando la amibiasis es endémica; ya que en estas zonas se ha encontrado la persistencia de estos anticuerpos por años al igual que en pacientes a los cuales se les ha erradicado la enfermedad. (70,21,10)

Con el fin de subsanar estas deficiencias se ha pensado que en el caso de amibiasis invasora el antígeno amibiano podría ser detectado en suero, mediante la técnica de ensayo inmunoenzimático. (77,03,30,47)

También se ha discutido que la detección inmune de este antígeno, sería de gran valor diagnóstico, demostrando una infección presente, siendo un mejor método o uno más sensible y viable. (03,10)

De hecho, existen antecedentes de que eso es posible. El antígeno amibiano circulante ha sido demostrado en abscesos usando contraelectroforesis², ensayos en fase sólida del componente C_{1q} del complemento^(3a), en heces por ELISA³ y en complejos inmunes circulantes o como antígeno sérico solamente^(50,03) usando radioensayos en fase sólida o bien ELISA. (77,00,10,70,47)

² Mencionado en 10

³ Mencionado en 03,10

El Lupus Eritematoso Sistemico o LES es una enfermedad con una gran variedad de anomalías inmunológicas como son la activación polyclonal de los linfocitos B, decremento en la función celular supresora, daño en la actividad celular citotóxica y un daño autólogo en la reacción de cultivo mixto de linfocitos. (70)

Por la multiplicidad de estos defectos inmunes en el LES se ha llegado a pensar que pudieran estar implicadas anomalías en las linfoquinas, potentes factores inmunorreguladores. (70)

Por su importancia inmunológica el Interferon γ (INF γ) parece ser el principal candidato, (70) esto es ya que el INF γ regula la blastogénesis de las células T y B, la producción de anticuerpos, la actividad celular citotóxica, la función celular supresora y la densidad de antígenos superficiales de las células. (70, 55)

Entonces se podría postular que defectos en la producción de esta linfoquina podría ser una de las etiologías de esta enfermedad, ya que muchas de las anomalías asociadas al LES se correlacionan con la actividad de esta linfoquina. (70)

En la literatura hay numerosos reportes de que los niveles de INF γ en pacientes con LES son normales o más bien un poco bajos. (70, 22, 30, 74) Esto contrasta con otros reportes donde se indica lo contrario, pero esto puede ser explicado ya que otros autores han reportado la presencia de un interferón α ácido lábil, (22, 74, 54) como lo es el INF γ y a diferencia del INF α clásico el cual es ácido estable, por lo tanto este interferón puede ser (y algunas veces ha sido) confundido con el INF γ en algunos reportes que mencionan títulos altos de este último. (80, 20)

Por otra parte algunos autores sugieren que hay cierta correlación entre los niveles de INF en general y los defectos inmunológicos

en LES. (80,20)

Estos descubrimientos aunados al reporte de que ciertos niveles de INF y pueden aumentar la producción de inmunoglobulinas por parte de linfocitos B (*in vitro*), provenientes de pacientes con LES^(17,20) (aunque también hay reportes de que en condiciones sutilmente diferentes el INF y inhibe la producción de anticuerpos anti DNA por parte de L_B en pacientes con LES⁽¹¹⁾) y que a la concentración sérica presente en estos pacientes, el INF no sería suficiente para activar la producción de las inmunoglobulinas.⁽²²⁾ nos hace pensar en el posible papel de un anticuerpo contra el receptor de INF ; que pudiera modificar los niveles (en cuanto a su acción fisiológica) del INF y .

De existir este anticuerpo en pacientes con LES esto nos podría explicar muchos de los defectos inmunológicos presentes en el LES; como podría ser la hiperactividad de los L_B al actuar estimulando al INF y o por lo contrario la baja actividad supresora de los L_T al bajar la respuesta supresora en los L_B por bajar la cantidad de receptores en las células T por la acción de este anticuerpo.

II

GENERALIDADES

- **INMUNOGLOBULINAS**
- **AMIBIASIS**
- **INTERFERON**
- **LUPUS ERITEMATOSO
SISTEMICO**

II.1-INMUNOGLOBULINAS

Las inmunoglobulinas comprenden un 20% de las proteínas séricas y representan el componente del suero el cual confiere la inmunidad. (28)

Las inmunoglobulinas fueron llamadas originalmente gammaglobulinas por su migración típica en electroforesis. Ahora es reconocido que las inmunoglobulinas migran también en las regiones α_2 y β . Esta diversidad electroforética refleja una variación en el contenido de carbohidratos y ácidos de las inmunoglobulinas. (28)

Todas las inmunoglobulinas tienen la estructura básica consistente en dos cadenas pesadas (PM 55.000 por cada una) y dos cadenas ligeras (PM 22 500 daltons) unidas por puentes disulfuro entre las dos cadenas. (28)

Cada cadena está conformada por cierto número de asas (o dominios) de dimensiones constantes formados por uniones entre cadenas con puentes disulfuro (Fleischmann et al 1963; Edelman et al 1960).¹

Los primeros 110 aminoácidos en el extremo terminal de las cadenas pesadas y ligeras se denomina la región variable y representa el sitio de unión con el antígeno. La porción remanente de las cadenas pesadas y ligeras es llamado región constante. (28)

La región comprendida entre la porción variable y constante es llamada usualmente la región "switch". (28)

En la región variable se ha encontrado cierto grado de homología pero también se han encontrado partes hipervariables, que se han identificado como las regiones que parecen contribuir directamente con el sitio de unión al antígeno y produce el antígeno idiotípico encontrado en todas las inmunoglobulinas. (28)

Basado en las características antigénicas y estructurales de la región constante, dos tipos de cadenas ligeras y 5 tipos de cadenas pesadas han sido descritas. (28)

Los tipos de cadena ligera son llamados kappa y lambda. Los tipos

¹ Citado en ref 12

de cadena pesada son designados como gamma, alfa, mu, delta, y epsilon. Estos tipos de cadena pesada corresponden con las 5 clases de inmunoglobulinas conocidas como IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. ^(105,12)

Las cadenas ligeras contienen dos dominios designados como VL y CL. Las cadenas pesadas contienen los dominios VH, CH₁, CH₂ y CH₃. Un dominio adicional, designado como CH₄, es encontrado en las cadenas pesadas μ y ϵ . ⁽¹⁰⁵⁾

Cada dominio ha sido asociado con una función biológica específica. ⁽¹⁰⁵⁾

La región bisagra está localizada en la cadena pesada entre los dominios CH₁ y CH₂, siendo responsable de la flexibilidad de la molécula de inmunoglobulina; consiste en aproximadamente 20 aminoácidos y es rica en prolina. ⁽¹⁰⁵⁾

En base al perfil proteico obtenido por la digestión proteolítica de las inmunoglobulinas por ciertas enzimas, estas han sido divididas en ciertas regiones que a continuación se mencionan:

La región bisagra es el sitio de acción de la enzima papaína produciendo dos fragmentos Fab (fijadores de antígeno) y un fragmento Fc (fracción cristalizable). ⁽¹⁰⁵⁾

El fragmento Fab contiene las cadenas ligeras enteras y el dominio VH y CH₁ de la cadena pesada lo cual le confiere la habilidad de unirse a ciertos determinantes antigénicos, pero sin muchas actividades biológicas de las inmunoglobulinas intactas. ^(105,23)

El fragmento Fc contiene los dominios CH₂ y CH₃ de la cadena pesada, este no puede unirse al antígeno, pero contiene el antígeno de clase y algunas de las actividades biológicas. ⁽¹⁰⁵⁾

La pepsina ataca la cadena pesada en el otro lado del dominio CH₂, resultando la producción de una molécula F(ab)₂ y péptidos pequeños (2 fragmentos Fc', que consisten en el dominio CH₃). El fragmento F(ab)₂ contiene los dos fragmentos Fab y la región bisagra con enlaces disulfuro intercadenas pesadas. ⁽¹⁰⁵⁾

El fragmento $F(ab)_2$ no solo puede unirse a antígenos, sino que por su naturaleza bivalente puede unir cruzadamente y por consecuencia precipitar antígenos. (05,25)

tabla 1

CARACTERISTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS

CLASE	TIPO Cadena PESADA	No. SUBCLASES	FÓRMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR	COCIENTE DE SEDIMENTACION	x OMO- HIDRATOS	CONC. MEDIA SÉRICA (mg/dl)	VIDA MEDIA (DÍAS)	FUNCION BIOLÓGICA
IgG	Gamma	4	H_2L_2	150 000	7	4	1 200	23	CRUSA PLACENTA. ACTIVA COMPLEMENTO VIA CLÁSICA.
IgM	Alfa	2	$(H_2L_2)_n$ ⁿ⁼¹⁻⁵	170 000	7,10,14	5	235	6	ANTICUERPO SECRETOR ACTIVO COMPLEMENTO VIA ALTERNA
IgM	Beta	1	$(H_2L_2)_n$ ⁿ⁼⁵	900 000	19	15	150	5	DISTRIBUCION LIMITADA A LOS ESPACIOS INTRAVASCULARES. ACTIVO COMPLEMENTO VIA CLÁSICA.
IgD	Delta	1	H_2L_2	165 000	7	10	5	2.8	ANTICUERPO CITOTÓXICO PARA LINFOCITOS.
IgE	Epsilon	1	H_2L_2	200 000	8	10	20 IU/ml	1.5	CITOTÓXICO PARA CELULAS GRANULOCITOSAS. MEDIA VIDA SEMIESTADOS INMEDIATA.

tabla 1. - MUESTRA VARIA DE LAS

CARACTERÍSTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS
EN FORMA RESUMIDA (13)

II.2-AMIBIASIS

La amibiasis es una enfermedad causada por el parásito *Entamoeba histolytica*.⁽²⁰⁾

Este parásito fue encontrado por vez primera por Lösch en 1875 en un paciente que sufría disentería crónica asociada a la presencia de amibas en las heces. Fue hasta 1897 cuando Kartulis demostró el papel patogénico de las amibas y describió la existencia de lesiones hepáticas amibianas.⁽²¹⁾

Ahora bien, la *E. histolytica* pertenece a la familia Entamoebidae, orden Amoebozoa, clase Rizópoda, y género Entamoeba; este género agrupa a un gran número de especies parasitarias dentro de las cuales *E. histolytica* es la más importante desde el punto de vista clínico.⁽²²⁾ El parásito presenta el siguiente ciclo biológico:

II.2.1.-CICLO BIOLÓGICO

Este protozoario tiene un ciclo de vida que presenta dos fases, la forma vegetativa o trofozoito y la forma infectiva o quiste.⁽²³⁾

El quiste es formado en el intestino grueso y expulsado con las heces, al ser ingerido por un nuevo hospedero, la cápsula de quitina que lo recubre se digiere por las secreciones intestinales desenquistándose a nivel del intestino delgado, liberando una amiba metaquistica tetranucleada, la cual tras sufrir una división nuclear, produce ocho amibas uninucleadas o trofozoitos. Estas pasan al intestino grueso en donde pueden permanecer en estado de comensal o penetrar la mucosa intestinal y alcanzar el hígado.^(22,23) A continuación se definen estos términos:

Quistes.—Los quistes son cuerpos redondos u ovales, con una cubierta rígida de quitina de 0.5 μ m de espesor. Los estados maduros son la fase infectiva, presentan cuatro núcleos pequeños a diferencia de los inmaduros que solo presentan un núcleo que

abarca casi la tercera parte del citoplasma. En conjunto miden entre 5 y 20 μm de diámetro. ⁽⁵²⁾

Trofozoito.-Es la forma vegetativa del parásito y la menos resistente; se reproduce por fisión binaria y bajo ciertas condiciones se diferencia en un quiste. Es una célula sumamente dinámica y pleomorfica, su forma y movilidad son susceptibles a los cambios en su ambiente fisicoquímico. Entre sus características más notables se encuentran: su elevada capacidad pinocítica y fagocítica, su capacidad de adherencia y su movilidad continua por emisión de pseudópodos. En conjunto su diámetro es aproximadamente de 15-50 μm . ^(25,51,5)

Ahora ya existe un medio de cultivo para mantener en propagación asexual ⁽¹⁷⁾ a los trofozoitos, con lo cual el estudio de estos se ve facilitado.

En cuanto a la infección amibiana, es frecuente encontrar el parásito sin causar daño aparente en el intestino humano; sin embargo, por factores que aun se desconocen, en ocasiones este protozoario destruye el epitelio intestinal provocando disenteria y colitis amibiana. En algunos casos logra invadir otros órganos, como es el hígado. ⁽²⁵⁾

II.2.2.-AMIBIASIS INVASORA

Los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* no se confinan únicamente al intestino, sino que pueden invadir otros tejidos como son el hígado, piel, pulmón, cerebro, etc. al diseminarse a través de los vasos sanguíneos o linfáticos. ⁽⁵⁰⁾

La invasión y destrucción de los tejidos del hospedador por la amiba es un acto suicida del parásito debido a que las amibas invasoras no pueden formar quistes y como consecuencia no pueden asegurarse una progenie que infecte nuevos hospedadores; es más, si la amiba mata al hospedador ella muere conjuntamente. No se ha determinado los factores que determinen que una amiba tenga un

comportamiento determinado. (25,50)

La lesión intestinal característica de la amebiasis se da si los trofozoitos logran penetrar la túnica muscular hasta la submucosa produciendo la úlcera en "forma de botella" característica de la amebiasis: un pequeño punto de entrada, que conduce por un cuello angosto a través de la mucosa a un área necrótica expandida en la submucosa, sin invasión bacteriana. La diseminación subsiguiente, puede hacer coalescer las colonias de amebas socavando grandes áreas de la superficie mucosa con lo cual ya se da la invasión bacteriana. (31)

Las características histopatológicas de las lesiones producidas por las amebas pueden apreciarse como un pronunciado edema en el epitelio gastrointestinal, con infiltración de células polimorfonucleares y macrófagos. Algunas de las células son destruidas y fagocitadas después del contacto con la ameba. En el absceso hepático amebiano, en los estadios iniciales se ha demostrado lesiones de tipo granulomatoso, en periodos tardíos, el tejido es reemplazado por una sola cavidad llena de material líquido que contiene restos celulares y que está rodeada por una banda de tejido conectivo que contiene fibroblastos. Hay pérdida progresiva de la vascularidad; los trofozoitos viables se encuentran en la cara interna del absceso, entre la zona de material necrótico y la banda de tejido conectivo. (30,33)

La amebiasis intestinal humana se caracteriza porque en muchos casos no se presentan datos clínicos de la enfermedad. (31)

El que una ameba se convierta en más agresiva depende de su virulencia. (30)

II.2.3.-VIRULENCIA

Se cree que todas las cepas de *E. histolytica* son potencialmente patógenas y la expresión de su virulencia depende de diversos factores, como son los siguientes agentes: Ciertas bacterias o virus y el colesterol (4). Posibles explicaciones sobre este efecto son

Las siguientes

BACTERIAS -Tal vez pueden contribuir en la virulencia de una cepa, al proporcionar un potencial oxidoreductor negativo (lo cual se ha visto que favorece el crecimiento ambiano) ⁽¹⁴⁾

VIRUS -Se sugiere que estos virus (los cuales se han detectado en algunas cepas ambianas), puedan transformar a las amibas con lo cual estas se haran mas virulentas Si los virus infectantes tuviesen una vida mas corta que los quistes que los portan, la transmision rapida del quiste a otro hospedador, permitiria la expresion de la virulencia ambiana, por otro lado si los quistes fuesen ingeridos cuando los virus ya perdieron su viabilidad, la amiba seria avirulenta, esta hipotesis explica la existencia de amibiasis clinica asintomatica, pero no esta apoyada por ninguna evidencia experimental. ⁽¹⁵⁾

COLESTEROL -Trofozoitos de *E. histolytica* que se cultivan en presencia de colesterol son mas virulentas para animales de experimentacion que cepas cultivadas sin esta condicion. El desarrollo de virulencia por estas cepas no tiene un mecanismo explicado. ⁽¹⁶⁾

Actualmente se ha buscado una clasificacion de las cepas de *E. histolytica* en base a la existencia de patrones isoenzimaticos diferentes entre cepas patogenas y las no patogenas (Sargeunt 1978 y en Mexico 1982) ¹ en base a las siguientes enzimas: *β*-glucosa fosfata isomerasa (GPI), *β*-glucuronidasa (FGM), *L*-asidato, *L*-DAP² oxidasa reductasa (ME) y *X*-oxidasa (HK)

Las amibas patogenas son parecidas en base a los patrones de los zimodemos FGM y HK. ^(16,17)

Otros aspectos de clasificacion es en base a su citotoxicidad y eritrofagocitosis al inducir absceso en ratones recién nacidos. ⁽¹⁸⁾

¹ citado en ref. 18

II.2.4.-INMUNIDAD Y AMBIASIS

II.2.4.1.-INMUNIDAD HUMORAL

Los anticuerpos en el suero son producidos regularmente durante la amebiasis sintomática y ocasionalmente en la asintomática. La etapa invasiva es acompañada de altos títulos de anticuerpos, los cuales decrecen después del tratamiento terapéutico, pero persistiendo a baja concentración durante algunos años. (25)

En la amebiasis intestinal se ha detectado niveles varios de coproanticuerpos (anticuerpos en heces fecales) entre los cuales predomina la IGA secretoria. Esta inmunoglobulina se piensa que tiene como función la de unirse a los determinantes antigenicos de la ameba con lo cual impide su union con los receptores celulares en la célula blanco. (30)

Esta inmunoglobulina aunada a otras, se ha encontrado también en secreciones externas diversas (como es el calostro y la leche materna en la cual, junto con la IgG₂ confieren inmunidad pasiva al producto). (30,21)

Esta inmunoglobulina puede permanecer en el "exterior" ya que es muy resistente a la proteolisis, además de que puede activar la vía alterna del complemento, lo cual puede proporcionar cierta función protectora y promueve la inflamación. (30)

En áreas endémicas, el nivel de inmunoglobulinas séricas específicas es normalmente alto destacándose el título de la IgG₂ y en menor proporción la mencionada IGA y la IgM. (25)

La exposición continua de los trofozoítos con anticuerpos trae consigo una disminución en la susceptibilidad de la lisis por anticuerpo y complemento. (3)

Sin embargo, en la infección no hay datos que apoyen el papel protector de los anticuerpos aunque in vitro se ha visto que las gammaglobulinas humanas inhiben el crecimiento de la E. histolytica, neutralizan la patogenicidad de la ameba y la IgG

humana inhibe la adhesión del trofozoito a las células blancas. En otros estudios se ha visto que macrófagos activados no potencializan su destrucción de amibas por medio de sueros inmunes.⁽¹⁰⁾

Es más, se sabe que los anticuerpos se unen homogéneamente a la superficie de los trofozoitos (in vitro) para posteriormente sufrir una distribución gradual hasta formar pequeñas vesículas o "caps" que son liberados finalmente en forma de agregados moleculares que contienen los complejos antígeno-anticuerpo. Lo cual se sabe que es una forma de evasión del sistema inmune por parte de la amiba.⁽¹¹⁾

El que los anticuerpos medien la baja en susceptibilidad de las cepas a la lisis por anticuerpos y complemento podría explicar que las cepas aisladas de pacientes con disentería amibiana o absceso hepático fueran menos susceptibles a la lisis por complemento comparadas con las cepas no patógenas.⁽¹²⁾

En condiciones normales el suero humano es citotóxico para los trofozoitos de *E. histolytica* al hacer funcional la vía alterna del complemento por medio de la activación del factor B.^(10,13)

La *E. histolytica* activa ambas vías del complemento en ausencia de anticuerpos específicos permitiendo la unión de C_3b a la superficie amibiana y produciendo la lisis de las amibas (Calderon y Schreiber 1985)². Actualmente Reed (1989)³ y cols demostraron que la amiba secreta una proteasa soluble neutra (PM 56 kDa) la cual corta el C_3 en 2 fracciones idénticas a la C_3a y C_3b producidas por las C_3 convertasas tanto de la vía alterna como de la clásica del complemento.^(10,13)

² Mencionado en ref 9

³ Mencionado en ref 10

II.2.4.2.-INMUNIDAD CELULAR

Los neutrófilos representan la respuesta inicial del hospedero a una invasión en el hígado por la *E.histolytica*, pero esta línea de defensa no es efectiva para destruir a este parásito, sucumbiendo en el intento; es más, la destrucción de los neutrófilos por la *E.histolytica* puede ser una de las etiologías del daño hepático. desarrollado es esta enfermedad al liberarse los lisosomas de los neutrófilos polimorfonucleares. (67)

Macrófagos derivados de monocitos pertenecientes a individuos no inmunes, cuando son activados con linfocinas (secretadas después de la activación de las células inmunes con lectinas), fueron capaces de destruir ambas virulentas, a diferencia de células mononucleares periféricas, monocitos y linfocitos T sin activar. La destrucción máxima ocurrió a las 18 hrs y se requirieron 10 macrófagos por cada ameba, los sueros inmunes no potenciaron esta destrucción. En esta destrucción están envueltos mecanismos oxidativos y no oxidativos de los macrófagos. (67)

También los linfocitos T, derivados de personas no inmunizadas previamente con *E.histolytica*, cuando son activados con fitohemaglutinina, o bien, los provenientes de pacientes curados de absceso hepático amebiano, al activarse con antígeno amebiano son capaces (in vitro) de destruir ambas virulentas (cepa HMI) y tal parece que lo hacen mediante productos solubles liberados al medio. (67)

Hay suficiente evidencia en la literatura de que el mecanismo seguido para la destrucción de los trofozoítos de *E.histolytica* por estas dos líneas celulares (macrófagos activados y L_1 citotóxicos) es como sigue:

El antígeno amebiano es directamente presentado a los L_1 , o bien más efectivamente por la captura y procesamiento por parte de los macrófagos, resultando en una sensibilización específica de los L_1 ; esta sensibilización produce una proliferación específica y liberación de linfocinas (especialmente INF γ , el cual juega un

papel en la activación de los macrófagos). Con esto el control de este parásito se basa en estas poblaciones celulares, y en un factor soluble, el cual suprime y está presente en el suero de los pacientes inmunizados con la presencia de este parásito. (67)

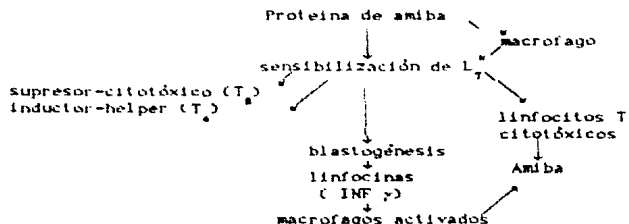


Figura 1.- evidencia encontrada acerca de las interrelaciones en la respuesta inmune celular contra *E. histolytica*. (Tomado de ref. 67)

II.2.5.-DIAGNOSTICO

Como ya se ha dicho el método estándar de confirmación de un diagnóstico de amebiasis intestinal se basa en la examinación de muestras o bien de mucosa intestinal, para la búsqueda de trofozoitos o quistes. (67)

Las técnicas seguidas para lograr este propósito están listadas en la tabla 2.

TABLA 2

TECNICAS PARA EL EXAMEN DE MUESTRAS PARA LA
PRESENCIA DE PROTOZOARIOS INTESTINALES

- Observación directa: salina/iodo
- Tinción directa con hematoxilina-hierro
- Tinción directa con tricromo
- Tinción con azul de metileno
- Solución de Sargeant
- Tinción con clorazol negro E
- Formol-iodo-merthiolate
- Fijación con alcohol polivinílico
- Fijación de Shaudin
- Formol (4-10%)
- Concentración por flotación con sulfato de zinc (FAUST)
- Flotación salina (WILLIS)
- Sedimentación con formol-eter (RITCHIE)
- Sedimentación con etil-acetato de formol
- Cultivo
- ELISA. (para muestras fecales)
- Inmunofluorescencia. (para muestras fecales)
- Otros.

Tomado de ref 77

Una comparación de estos métodos demuestra que la técnica de examen por concentración con formol-eter detecta un 40-50% más de infecciones que el examen directo de muestras con solución salina o bien con Iodo. (77)

El examen con formol-Iodo-Merthiolate detecta un 85-92% de muestras positivas y demuestra un 30-50% más de infecciones por *E. histolytica* que la combinación de las otras tres tinciones ya

sea sin concentrar, o bien, por métodos de concentración solos (con sulfato de Zinc, o bien por eter-formol). (77)

En el caso de Amibiasis invasora, o en algunos periodos de la amibiasis intestinal, no es probable encontrar el parásito en las muestras. En estos casos es más conveniente el uso de las TECNICAS SEROLOGICAS. Como ya se ha dicho un 85-90% de los pacientes con absceso hepático presentan niveles de anticuerpos circulantes detectables por los metodos listados en la tabla 3

TABLA 3

TECNICAS SEROLOGICAS EN AMIBIASIS

- Hemaglutinación indirecta (IHA)
- Aglutinación con latex (LA)
- Inmunofluorescencia indirecta (IF)
- Inmunolectroforesis (IEP)
- Contrainmunolectroforesis (CEP o CIE)
- Difusión en agar (Inmunodifusión) (AGD)
- ELISA
- Fijación con bentonita (BF)
- Fijación de complemento (CF)
- Otros.

Tomado de ref 77

La sensibilidad, especificidad y comparabilidad de estos métodos varia substancialmente .el IHA es alrededor de 5 veces más sensitivo que el CEP. La IHA tal vez puede detectar anticuerpos despues de varios años de una invasión amibiana, en cambio el CEP probablemente solo detecta cuando la amibiasis invasiva es activa. (77)

Estas tecnicas serológicas tienen varios inconvenientes en su aplicación a la amibiasis ya que solo un 50-80% de los pacientes con disenteria amibiana que requieren hospitalización, presentan

anticuerpos circulantes (Ambroise-Thomas 1976, Kagan 1980, Lobel y Kagan 1978)⁴ y en una proporción mucho menor presentan anticuerpos los pacientes con diarrea por la presencia del parásito.⁽⁷⁷⁾

-OTROS

Otros tipos de diagnóstico son las pruebas funcionales de posibles órganos afectados como son el pulmón, hígado, cerebro, etc; esto aunado a posibles exploraciones, gammagrafías, tomografías, sonografía o bien rayos x, pueden llevarnos a complementar un diagnóstico certero.⁽⁷⁷⁾

II.2.6.-EPIDEMIOLOGIA

Los datos antes mencionados nos orientan a pensar que esta infección es muy importante mundialmente; esto nos lleva a preguntas sobre la epidemiología de esta enfermedad.⁽⁷⁸⁾

Los quistes son por lo general ingeridos con el agua contaminada en los trópicos, las verduras y alimentos contaminados constituyen fuentes importantes de quistes; las moscas y cucarachas han sido incriminadas en zonas donde hay deposición fecal al aire libre.⁽⁸¹⁾

Esto nos deja entrever que el problema de la infección ambiental involucra malos hábitos y costumbres; por ejemplo los portadores asintomáticos de quistes o aquellos que presentan una infección crónica se habitúan a ello y pasan a ser portadores de amebiasis, siendo posiblemente responsables de brotes epidemiológicos graves, el fecalismo al aire libre, mala higiene local y personal, el que los portadores manejen alimentos, el regado de verduras con aguas negras, mala conservación y exhibición de los alimentos, un pobre control de la calidad del agua potable, ayudan a la diseminación de esta enfermedad.

Como es de pensarse esto ocurre en las zonas más densamente pobladas y con facilidades sanitarias muy pobres (como es el caso de México y

⁴ Mencionado en ref 77

Venezuela donde de un 2 a un 15% de los niños requieren hospitalización por diarreas asociadas a *E. histolytica*, o bien en instituciones mentales geriátricas o infantiles.^(78,81)

También puede darse brotes de esta enfermedad en poblaciones donde las técnicas de diagnóstico de amebiasis no son usadas comúnmente y que pueden resultar en diagnósticos erróneos.⁽⁷⁸⁾

Muchos otros factores pueden contribuir con la infección ambiental como son algunos de los siguientes:

Desnutrición. -Una dieta rica en carbohidratos y baja en proteínas favorece la disenteria ambiental en animales de experimentación y en muchos casos de la enfermedad en humanos. La desnutrición parece producir un decremento en la inmunidad del hospedero.^(78,81)

Algunos componentes alimentarios. -También parecen contribuir en esta infección; estos pueden ser el alcohol etílico, el picante y las tortillas (cuando estas presentan concentraciones de aflatoxinas).⁽⁸¹⁾

La edad. -Este aspecto parece ser de importancia ya que por ejemplo niños de alrededor de 2 años presentan una morbilidad demasiado alta ante esta enfermedad ya que en estos el diagnóstico es sumamente difícil.^(81,78)

Otras enfermedades. -Otras enfermedades intestinales pueden sinergizar con la amebiasis o bien dificultar su diagnóstico diferencial, por ejemplo tenemos la giardiasis, la enfermedad por *Ascaris*, *Trichuris*, *Enterobios*, etc.⁽⁸¹⁾

Particulares de diferentes grupos. -Dentro de estos tenemos varios ejemplos, como son los inmigrantes de zonas endémicas a zonas no endémicas.^(81,78)

Personas con prácticas sexuales muy particulares como son los homosexuales, ya que se ha visto que en Estados Unidos, los hombres homosexuales presentan un 30% más de riesgo de presentar esta infección que el resto de la población.⁽⁷⁸⁾

Y por último también pueden haber infecciones sépticas, las cuales se han visto después de una hospitalización e intervención

quirúrgica (principalmente a nivel del sistema digestivo), presentando tiempo despues fistulizaciones. (81,78)

II.2.7.-MORBILIDAD Y MORTALIDAD

Aproximadamente un 10% de la población mundial acarrea este parásito en su cuerpo y solo un pequeño porcentaje sufre la enfermedad. En algunos lugares como es México, es una de las 10 principales causas de mortalidad. (77)

En 1979, una encuesta mundial detecto alrededor de 20 000 individuos infectados, de los cuales se encontró un 5.98% de personas con niveles detectables de anticuerpos usando contrainmunolectroforesis. (77)

En la literatura mundial hay grandes limitaciones acerca de la prevalencia, incidencia, morbilidad y mortalidad de la amibiasis. Probablemente el país que tiene mayor información sobre las muestras y diagnóstico serológico es México. (77)

La diarrea por amibas probablemente ocurre 5-50 veces más frecuentemente que la enfermedad hepática. (77)

En México, se ha reportado que por cada caso de amibiasis clínica existen 4.5 portadores asintomáticos. (81)

En este país la frecuencia de absceso hepático amibiano es mayor en la edad adulta y predomina en personas del sexo masculino en una proporción de 5 a 1. (80)

Alrededor de un 90% de los pacientes con enfermedad hepática desarrollan niveles medibles de anticuerpos contra amiba.

Basado en la población mexicana en 1984 (77 millones de personas) se estima que 3.9 millones de personas desarrollan anticuerpos contra este parásito anualmente y de 5.5 -7 millones de personas presentan casos clínicos que van desde moderados a severos. Entonces la amibiasis puede causar de 10 000-30 000 muertes al año en México solamente. (77)

TABLA 4

PREVALENCIA GLOBAL E INCIDENCIA DE AMIBIASIS
1984

CONTINENTE	INFECCION $\times 10^6$	ENFERMEDAD (abscesos y colitis)	MUERTE $\times 10^{-3}$
Norte y sudamérica	95	10×10^6	10 - 3
Africa	85 ¹	10×10^6	10 - 3
Europa	20	10×10^4	—
Asia	300	20×10^3 a 30×10^6	20 -
TOTAL	500	40×10^3 a 50×10^6	40 - 1

Tomado de ref 77

Como se ve en esta tabla en 1984 probablemente 500 millones de personas acarreaban el protozooario en su tracto intestinal, en el mejor de los casos unos 40 millones de personas desarrollaron colitis y 40 000 personas murieron en este año.

Estos estudios han sido desarrollados en los pasados 15 a 20 años y durante este periodo la prevalencia de la amibiasis parece que no ha cambiado. (77)

II.2.8.-TRATAMIENTO

El tratamiento de una infección amibiana puede llegar a ser algo complicado debido a la necesidad de utilizar una terapia combinada de varios medicamentos, esto debido a la asociación vista entre las amibas y bacterias intestinales, además de las toxicidades relativas de estos medicamentos antiambianos. (81,82)

Debido a la variabilidad de los índices de curación cuando dependen de la terapéutica con un solo medicamento y debido al peligro de infecciones hepáticas no detectables, en la actualidad se recomienda, en los casos con sintomatología, el siguiente tratamiento con medicamentos combinados:

1) Para la enfermedad intestinal leve a moderada: metronidazol más furoato de diloxanida o diiodohidroxiquina; o paromomicina seguida por cloroquina; o furoato de diloxanida o diiodohidroxiquina más una tetraciclina seguida por cloroquina. (81)

2) Para la enfermedad intestinal grave (disenteria amibiana): dihidroemetina (o emetina), oxitetraciclina o furoato de diloxanida, seguido por cloroquina; o metronidazol seguido por furoato de diloxanida. (81)

3) Para complicación hepática o cualquier otra extraintestinal o para ameboma: metronidazol seguido de diloxanida, más cloroquina, o dihidroemetina (o emetina) más cloroquina y furoato de diloxanida. (81)

TOXICIDAD

La mayoría de estos medicamentos presentan severos inconvenientes debido a su toxicidad. Por ejemplo:

Diiodohidroxiquina. -Provoca furunculosis, fiebre, diarrea e interfiere en las hormonas tiroideas. (82)

Furoato de diloxanida. -Provoca solo males gastrointestinales, los pacientes pueden completar un tratamiento de 10 días sin ningún accidente. (82)

La dihidroxiemetina. -Reduce grandemente los efectos adversos

asociados a la emetina consistente en problemas presentes en multiples órganos. (53)

El metronidazol presenta efectos tóxicos relativamente leves a comparación con los otros medicamentos como son náuseas, vómito, anorexia y una neutropenia reversible. (53)

En base a esta relativa toxicidad actualmente se buscan medicamentos libres de estos efectos adversos. (31,53)

En la actualidad con el objeto de proporcionar un nuevo anebicida luminal de alta potencia, en el instituto de investigación Sterling Winthrop se sintetizó y desarrollo la Quinfamida, un dicloroacetil quinolinol; los estudios en adultos (tabletas y en niños (suspension) han revelado que la quinfamida es eficaz en el tratamiento de un solo día de la amebiasis en el lumen intestinal crónica y subaguda, con una dosificación optima de 300 mg administrados en dosis fraccionadas de 100 mg cada ocho horas (en el caso de niños menores de 2 años la dosis es exactamente la mitad). (2)

II.2.9.-CONTROL

Una vez que conocemos el tratamiento y la epidemiología de esta enfermedad se pueden dar varias medidas preventivas y de control para poder erradicar esta infección, las cuales se darán a continuación; el único empero encontrado a esto es el que estas medidas pueden ser muy fáciles de seguir en países del primer mundo, en donde esta enfermedad es prácticamente inexistente, no siendo lo mismo en aquellos países donde la amebiasis es endémica (países del tercer mundo). (54)

Las medidas de control consisten en mejorar la salubridad del medio y el manejo sanitario de los alimentos, la aplicación de nuevas herramientas en el reconocimiento de la enfermedad (las cuales pueden determinar otras maneras de transmisión), determinar el posible papel del contacto persona a persona.

a animales domesticos, y determinar la cantidad y calidad del agua. El tratamiento de los portadores es controvertido, aunque se conviene en que debe de prohibirse a tales personas el manejo de alimentos. (61)

El peligro de transformacion de una infeccion de lumen asintomatica a enfermedad tisular invasiva, asi como la posible contaminacion ambiental, deberan considerarse en la decision del tratamiento para una persona asintomatica que arroja quistes. (31,61)

No existe todavia un medicamento seguro y eficaz para la quimioprofilaxis, y la mezcla de medicamentos requerida para la terapia confirman los problemas y el estado no satisfactorio del tratamiento de la amebiasis. Es más, en estos dias, por el gran tiempo de terapia requerido para la eliminacion del organismo, y el costo de la campaña necesaria para esto, las actuales administraciones son reacias a considerar una quimioterapia masiva a la poblacion. (78)

Las investigaciones futuras a largo tiempo estan dirigidas hacia la produccion de una vacuna efectiva, se piensa que esta debe de envolver preferentemente a la inmunidad celular, tambien se han orientado a prevenir la enquistacion y exquistacion, para controlar y prevenir la transmision de la E. histolytica, y hasta el momento se sigue trabajando sobre esto. (61)

II.3.-INTERFERONES

El Interferón fue descubierto en 1957 por Isaacs y Lindenmann como un factor soluble que interfiere la replicación viral, además de poseer actividad proliferativa e inmunomoduladora potente. (25)

Dependiendo de su célula primaria de origen, su variedad antigénica y al estímulo de inducción, los interferones se dividen como lo marca la tabla 5.

TABLA 5

CLASIFICACION DE INTERFERONES

INTERFERON	PRINCIPAL FUENTE CELULAR	ESTIMULO INDUCTOR	PM DE LA FORMA MONOMERICA NATURAL	GLICO-SILICION	ESTABILIDAD AL CALOR Y pH < 2
TIPO I (ESTANDAR)					
α	Leucocitos	virus o RNA df	(18-20) x 10 ³	NO	SI una sub es pecto NO
β	Fibroblasto	virus o RNA df	23 000	SI	SI
TIPO II (INMUNE)					
γ	Linfocitos T	Mitógeno, anti- geno, lectina o complejos inmunes	(20-25) x 10 ³	SI	NO

Tomado de ref(25,29,30)

Como ya se ha dicho los interferones tienen gran actividad en la función celular tal como lo muestra la tabla 6

TABLA 6

ALGUNOS EFECTOS DE LOS INTERFERONES EN LA FUNCION CELULAR⁽³³⁾

INHIBE

- Proliferación celular
- Crecimiento de tumores
- Diferenciación de fibroblastos y adipocitos

ESTIMULA

- Diferenciación celular leucémica promielocítica y monoblástica
- Fagocitosis por macrófagos
- Funciones de célula accesoria de macrófagos (INF γ y α, β)
- Secreción de IL-1 por los macrófagos inducida por endotoxina (INF γ y α, β)
- Generación de linfocitos T citotóxicos
- Expresión de antígenos de histocompatibilidad y receptores Fc en la superficie celular

EFECTOS MIXTOS

- Diferenciación de Célula eritroleucémica
 - Producción de anticuerpos
 - Fenómenos inmunológicos mediados por células.
-
-

Estos datos nos orientan a encontrar bases para la teoría de que el INF pueda estar implicado en la enfermedad Lupus Eritematoso Sistémico.

II.4.-LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

Osler en 1895 describió por primera vez las manifestaciones generales del Lupus Eritematoso Sistemico (o LES)

Con esto se dejó de pensar en esta enfermedad como un padecimiento cutaneo desfigurante pero no mortal, para descubrir que es una enfermedad inflamatoria cronica generalizada, la cual sigue un curso de exacerbaciones y remisiones alternadas. La afeccion de multiples organos ocurre de manera característica durante los periodos de actividad de la enfermedad. ⁽³⁸⁾

La frecuencia de contraer esta enfermedad es mayor entre individuos no caucasicos (particularmente de raza negra) que entre los sujetos de raza blanca. La enfermedad como ya se ha dicho afecta predominantemente a las mujeres en edad de procreación; estudios recientes han de mostrado que los estrógenos intensifican la formación de anticuerpos anti DNA y aumentan la gravedad de la nefropatia en modelos de laboratorio. Los andrógenos tienen un efecto opuesto. ⁽³⁸⁾

La causa es desconocida pero se tienen dos teorías principalmente acerca de la etiología y estas son las siguientes:

1. -LES inducido por una enfermedad viral. -En pacientes con LES se han encontrado anticuerpos contra algun virus y partículas virales como inclusiones intracelulares en los túbulos renales (que hacen pensar en un virus de RNA tipo C) ^(38, 40, 4, 81)

2. -Desbalance inmune. -Problemas o no balance en la inmunidad celular y humoral con una subsecuente formación anomala de anticuerpos y formación de complejos tóxicos. ^(40, 81)

II.4.1.CARACTERISTICAS CLINICAS

Sintomas y signos

El LES no presenta un patron clínico característico. El Comienzo puede ser agudo o insidioso.

Los síntomas generales incluyen fiebre, pérdida de peso, malestar y letargo. Cualquier órgano de cualquier sistema puede estar afectado. (38)

A continuación se hace una descripción breve de las posibles manifestaciones clínicas en algunos órganos y sistemas:

1.-Piel.-La lesión cutánea más común es una erupción eritematosa que afecta zonas del cuerpo expuestas de manera crónica a la luz ultravioleta. Además, se pueden observar vesículas, manchas de vitiligo, nodulos subcutaneos y engrosamiento de la piel, son comunes las lesiones vasculíticas. (39)

2.-Articulaciones y músculos.-La poliartralgia o artritis es la manifestación más común del LES (90%). La artritis es simétrica y puede alterar cualquier articulación del cuerpo. Puede asemejarse a la artritis reumatoide pero sin las lesiones óseas tan intensas. La necrosis avascular ósea es un hallazgo frecuente. La cabeza del fémur es la afectada con mayor frecuencia. Son frecuentes las mialgias con o sin miosis franca. (40)

3.-Corazón.-La pericarditis es la forma más común de afección cardíaca y puede ser la primera manifestación del LES. Suele ser benigna, solo con ligera molestia torácica y frote pericárdico; pero en ocasiones hay pericarditis grave que provoca taponamiento. La endocarditis del Lupus Eritematoso Sistémico es muy difícil de diagnosticar. (41)

4.-Pulmónes.-La forma más común de afección pulmonar luposa es la enfermedad pulmonar intersticial restrictiva que puede ser asintomática e identificable solo mediante pruebas de función pulmonar. Otras manifestaciones pulmonares pueden ser hipertensión pulmonar, hemorragia alveolar, neumotórax, hemotórax y vasculitis. (42)

5.-Riñón.-La afección renal constituye una característica grave muy frecuente en los enfermos con LES (65% de nefritis). (43)

El estudio del tejido renal mediante microscopía electrónica e inmunofluorescencia ha descubierto cuatro lesiones histológicas relacionadas con características clínicas muy precisas:

a) Glomerulonefritis mesangial. -Caracterizada por hiper celularidad y depósito de complejos inmunes en el mesangio. (38)

b) Glomerulonefritis focal. -Con proliferación segmentaria en menos del 50% de los glomérulos. Deposición de complejos inmunes en el mesangio y en el subendotelio del capilar glomerular; puede progresar a una lesión proliferativa difusa. (38)

c) Glomerulonefritis proliferativa difusa. -Caracterizada por una proliferación celular extensa en más del 50% de los glomérulos. Los complejos inmunitarios se depositan en su mayor parte en los subendotelios. Este proceso conduce con frecuencia a insuficiencia renal. (38)

d) Glomerulonefritis membranar. -En el la celularidad glomerular es normal, pero la membrana basal de los capilares está engrosada. Lo complejos inmunitarios se depositan principalmente en las áreas subepiteliales y membranosas. Esta lesión se asocia con el desarrollo de insuficiencia renal. (38)

6. -Sistema nervioso. -La afección cerebral es una complicación que pone en peligro la vida de los enfermos con LES. Puede presentarse desde psicosis, depresión, hasta convulsiones y afectar los nervios craneales, meningitis aséptica, migraña, herritis periférica y accidentes vasculo cerebrales. (38)

7. -Sistema vascular. -En el LES las manifestaciones de la vasculitis incluyen hemorragias en astilla, infartos de la pulpa digital, en las que son gastrointestinales provocan diarrea, colecistitis, pancreatitis, dolor abdominal. La neuropatía periférica en "media y guante" del LES se debe al daño a pequeños vasos. (38)

En base a estos daños se pueden encontrar generalmente los siguientes datos de laboratorio, los cuales ayudan al diagnóstico de esta enfermedad:

II.4.1.1.-DATOS DE LABORATORIO

La anemia es la manifestación más común en el LES; un 80% de los enfermos presentan una anemia normocromica normocítica, por la supresión funcional de la médula ósea. La leucopenia y trombocitopenia se presentan con frecuencia. (38)

La cuenta leucocitaria no excede de 4 000/ml, la mayoría de los cuales son linfocitos. El análisis general de orina muestra hematuria, proteinuria y cilindros de eritrocitos y de leucocitos. En el Lupus del sistema nervioso central, la concentración de proteínas del líquido cefalorraquídeo está elevada, en algunas ocasiones existe una linfocitosis leve. Los pacientes con enfermedad focal del sistema nervioso central pueden tener anticuerpos anti neuronales en el líquido cefalorraquídeo. (38)

II.4.2.-DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO

Este diagnóstico se puede llevar a cabo a diferentes niveles:

A) PROTEINAS Y COMPLEMENTO

Un 80% de los enfermos con LES presentan elevación de las globulinas α_2 y γ . En la enfermedad activa el complemento en el suero está frecuentemente disminuido a causa del aumento en su consumo para formar complejos inmunes, por reducción en su síntesis o por una combinación de ambos factores. Los factores C_3 , C_4 y la actividad total del complemento hemolítico están disminuidos, en tanto que la del complejo de ataque C_{3-9} aumenta durante la enfermedad. Hay presencia de crioglobulinas en forma de complejos circulantes con el complemento. (38)

B) AUTOANTICUERPOS

A este nivel el diagnóstico esta a su vez dividido en los siguientes puntos:

1) Fenómeno de Celula LE. -Este fenómeno fue descrito por primera vez en 1948 por Hargraves. Es una célula fagocítica, un neutrófilo en general que engloba a la masa nuclear liberada por otras

células. Se puede preparar al incubar al suero del paciente con LES y- la sangre entera (o la capa leucocitaria) de un donador normal. Sin embargo, esta técnica relativamente engorrosa y poco sensible es más bien de tipo histórico. (8,38)

2) Anticuerpos antinucleares (AAN). - Los anticuerpos antinucleares pertenecen a casi cualquiera de los tipos de inmunoglobulinas, estos son comunmente vistos por inmunofluorescencia destacandose 8 patrones morfológicos de tinción; siendo que solo cuatro tienen significado clínico y solo tres estan asociados al LES. Estos tres son los siguientes:

a) Patrón "homogeneo" (difuso o sólido). - Dado por anticuerpos antihistona. En este patrón, el núcleo muestra tinción uniforme y difusa. (39)

b) Patrón "delineado" (afelpado o periférico). - Es dado por la presencia de anticuerpos anti DNA-ds y para las nucleoproteínas solubles; en leucocitos humanos se denota mejor el patrón.

c) Patrón "mosaico". - Refleja presencia de anticuerpos contra constituyentes nucleares diferentes al DNA (el antígeno sm(Smith) y el antígeno RNP (ribonucleoproteína)) extraibles del núcleo por medio de solución salina; el antígeno RNP puede cruzar con otras enfermedades. (39)

3) Anticuerpos anti DNA. - En el suero de pacientes con LES se pueden encontrar 3 tipos de anticuerpos anti DNA.

a) Como DNA de una tira (o filamento). - Sola o desnaturalizada (anti DNA-ss).

b) Como DNA de doble tira o "native" (anti DNA-ds). - y

c) El anticuerpo que reacciona contra cualquiera de las dos (una o dos tiras). (39)

Estos anticuerpos pueden ser IgG o IgM. Los títulos altos de anticuerpos anti DNA-ds se ven esencialmente en el LES. En contraste los anticuerpos anti DNA-ss son inespecificos y pueden hallarse en otras enfermedades autoinmunes. (39)

Los anticuerpos anti DNA pueden medirse por fijación de complemento , los anticuerpos DNA-ds de elevada avidéz están íntimamente ligados con la aparición de transtorno renal.

4) Anticuerpos anti eritrocitarios.-Estos anticuerpos se dan con una frecuencia del 10-65% y pueden ser detectados mediante la prueba de Coombs; la anemia es rara. ⁽³⁸⁾

5) Anticoagulantes circulatorios y anticuerpos antiplaquetarios. -

En un 10-15% de los pacientes con LES se desarrolla al parecer un anticuerpo contra un fosfolípido, el cual prolonga los tiempos de tromboplastina parcial y protrombina; este puede dar una reacción VDRL falsa positiva. También se han descrito anticuerpos específicos anti Factor VIII y pueden estar asociados por su potencia a hemorragias. Los anticuerpos contra las plaquetas se encuentran en un 75-80% de los enfermos con LES; este anticuerpo no inhibe la retracción del coágulo. probablemente inducen trombocitopenia por efecto directo sobre la membrana de la superficie de las plaquetas. ⁽³⁸⁾

6) Factores reumatoides.-Casi un 30% de los enfermos con LES tiene una prueba positiva de fijación del látex para los factores reumatoides. ⁽³⁸⁾

7) Anticuerpos anticitoplásmicos.-Numerosos anticuerpos anticitoplásmicos (antimitocondriales, antirribosómicos y antiliscosómicos) han sido hallados en enfermos con LES. Estos anticuerpos no son específicos de órgano ni de especie. Los anticuerpos antirribosómicos son hallados en el suero de un 25-50% de los pacientes. El determinante antigénico principal es el RNA ribosómico. ⁽³⁸⁾

C) MHC y LES

A este nivel se han encontrado a últimas fechas los siguientes puntos, los cuales pueden servir para complementar un diagnóstico:

1)HLA.-Se ha tratado de buscar un factor genético asociado a esta

enfermedad. En fechas recientes se ha encontrado cierto grado de relación con el LES y los alelos del HLA; en un tiempo el LES fue muy relacionado con el HLA-B8, en la actualidad se le asocia con DR2 y DR3 (75%).^(38,20)

2) Anticuerpos. - Tal parece que la formación de anticuerpos en esta enfermedad está determinado genéticamente en parte; por ejemplo es mas probable que los pacientes con HLA DR2 produzcan anticuerpos anti DNA-ds, en tanto que quienes tienen HLA DR3 y HLA DR7 producen anticuerpos anti DNA-ss-A.⁽³⁸⁾

Por otro lado en 1989 se demostró que en el LES se encuentran anticuerpos contra proteínas que se unen a una región promotora del gen que codifica las proteínas clase I HLA A2.⁽⁴⁴⁾

3) Complemento. - Entre los loci HLA-B y HLA-DR, se localizan cuatro loci que codifican a las moléculas de clase III que son proteínas que codifican como convertidas de C₃, la C₂ y C₄; varias deleciones genéticas a este nivel parecen correlacionar claramente con un síndrome semejante al LES.⁽²⁰⁾

En 1987 se demostró que se podían usar los complotipos (o haplotipos del complemento) como marcadores del MHC, y como marcadores de predisposición genética para padecer LES; y en especial los siguientes: SC 01 y SC 30-2.⁽²⁰⁾

Hay otro tipo de Lupus, el cual es de gran importancia en nuestro sistema de búsqueda de un Ac contra el receptor de INF γ , ya que podría implicar un falso positivo en nuestros sueros.

II. 4. 3. - Síndrome lupoide inducido por medicamentos

Ciertos medicamentos pueden provocar un cuadro semejante al lupus en individuos sensibles; estos medicamentos pueden ser la hidralazina y la procainamida, pueden inducir alopecia, artritis, erupción cutánea y anticuerpos contra DNA de raramente. La enfermedad habitualmente desaparece, cuando el medicamento se discontinúa. La lista de medicamentos que inducen este estado aumenta rápidamente, incluyendo hasta el momento

más de 21 medicamentos; algunos ejemplos son los siguientes: anticonceptivos orales, antibióticos como son los sulfonamidas, griseofulvina y penicilamida. (28)

II.4.4.-TRATAMIENTO

Dependiendo de la gravedad de la enfermedad, quizá no necesite tratamiento el enfermo o bien puede ser mínimo (aspirina, antipalúdicos) o intenso (glucocorticoides, medicamentos citotóxicos). También es sabido que en el LES puede ocurrir la remisión espontánea. (29)

Lo arriba expuesto implica que el uso de estos medicamentos se basa en el grado de avance de la enfermedad y el tratamiento se da de la siguiente manera:

La aspirina o algún fármaco antiinflamatorio no esteroide de acción rápida es indicado cuando el síntoma predominante es la artritis, sin afectar otros órganos significativamente.

Los antipalúdicos son el tratamiento cuando la piel y las mucosas están afectadas de manera predominante; solo es necesario evitar la toxicidad retineana. (30)

El empleo de glucocorticoides por vía general en el LES grave puede suprimir la actividad de la enfermedad, prolongando la vida. (en ausencia de LES fulminante la administración de glucocorticoides es peligrosa e innecesaria.) (31)

Investigaciones recientes indican que uno o más cursos de tratamiento "intermitente" (por ejemplo 15 mg/kg/día por vía intravenosa durante tres días) pueden ser eficaces en pacientes con enfermedad refractaria.

Si el estado clínico e inmunológico del enfermo no mejora o si ocurren efectos colaterales graves por el tratamiento con glucocorticoides, está indicada la terapéutica inmunosupresora con agentes citotóxicos, como es la ciclofosfamida, clorambucil o azatoprina. Por causar efectos colaterales (toxicidad

hepática, cáncer, supresión de la médula ósea) estos medicamentos deben ser empleados con discreción. La tasa de supervivencia de 5 años de los enfermos con LES ha mejorado notoriamente durante la última década y en la actualidad se aproxima a un 80-90% (38)

Así, en el presente trabajo se produjeron dos anticuerpos que determinaron antígeno soluble de *E. histolytica* e IgG humana respectivamente, de forma específica. Estos anticuerpos abarcan varios de los campos trabajados actualmente en la Inmunología. Para probar su actividad se diseñaron dos inmunoensayos para éstos, con el fin de desarrollar los objetivos expuestos a continuación.

III.-OBJETIVOS

III.-OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Obtener un anticuerpo policlonal por inmunopurificación, el cual determine antígeno total de *Entamoeba histolytica*, así mismo determinar su sensibilidad.
- Obtener un anticuerpo policlonal específico que determine IgG humana y determinar su grado de sensibilidad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Probar la actividad del anticuerpo de conejo anti *E. histolytica* por medio de un inmunoensayo enzimático en fase sólida (ELISA) para la Detección de antígeno amebiano en el suero de pacientes con absceso hepático amebiano.
- Probar la actividad del anticuerpo de carnero anti IgG humana en el inmunoensayo Búsqueda de un anticuerpo contra el receptor de interferón gamma en el suero de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico.

IV

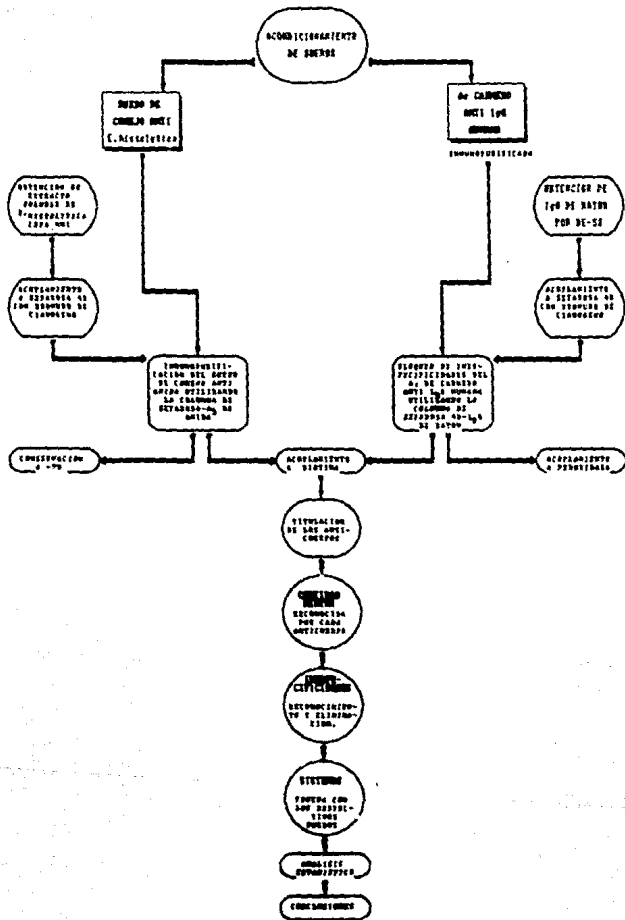
MATERIAL Y METODOS

A)Ac DE CONEJO ANTI AMIBA

**B)Ac DE CARNERO ANTI IgG
HUMANA**

TRATAMIENTO ESTADISTICO

DIAGRAMA DE FLUJO



IV.-MATERIAL Y METODOS

La presente sección será separada en dos apartados con el fin de cumplir las dos propuestas mencionada en la sección de objetivos. 1)Un apartado que trata sobre un anticuerpo inmunopurificado dirigido contra antígeno de *E.histolytica* y acoplado a un marcador.

2)El segundo es sobre un anticuerpo inmunopurificado dirigido contra IgG humana acoplado a un marcador.

Cada apartado a su vez consta de 2 partes:

La primera es relativa a la inmunopurificación,acoplamiento a un marcador,sobre pruebas rigurosas de sensibilidad y especificidad de estos anticuerpos con el fin de que puedan actuar como reactivos para inmunoensayos.

La segunda que trata sobre la prueba de la actividad de cada uno de estos anticuerpos en los inmunoensayos diseñados para este efecto y que ya fueron mencionados anteriormente en INTRODUCCION.

A continuación se indican los materiales y metodologías utilizadas en esta tesis.

IV.1.-ANTICUERPO DE CONEJO ANTI *E.histolytica*

IV.1.1.-OBTENCIÓN DEL ANTICUERPO

IV.1.1.1.-ACONDICIONAMIENTO DEL SUERO

Para tal efecto se hizo un "banco" con dos lotes de sueros de conejo anti *E.histolytica*,los cuales se encontraban a -70°C en un ultracongelador REVCO en el laboratorio No.15 del departamento de Biología Celular del CINVESTAV IPN. Estos lotes fueron los siguientes:

- 1)Lote 169-B productor de "caps" medianos (100 ml)
- 2) Lote 24/VII/80 de suero de conejo anti *E.histolytica* cepa HM1-A (100 ml).

Estos lotes se descongelaron dejándolos llegar a una

temperatura de 4°C sobre hielo picado de tal forma que se evitó la desnaturalización de las proteínas.¹

Los lotes se mezclaron y clarificaron pasándolos dos veces por un prefiltro (de los usados para esterilización por filtración) El suero se filtró otras 2 veces con papel Whatman No 50 y por último 2 veces con un filtro Millipore con un poro de 0.8 micras.

IV.1.1.2. -INMUNOPURIFICACION DEL ANTICUERPO DE CONEJO ANTI *E. histolytica*

IV.1.1.2.1. -OBTENCION DEL EXTRACTO SOLUBLE DE *E. histolytica* CEPA HMI

Durante 4 dias se expandió *E. histolytica* cepa HMI² en 120 tubos de cultivo de 13 ml de capacidad conteniendo 10 ml de medio de cultivo TYI-S-33 de Diamonds⁽¹⁷⁾ suplementado con suero de ternera (Microlab:605) al 15% y complementado con una mezcla vitamínica de Diamonds (North American Biological) al 1.5%

IV.1.1.2.1.1. -Cosecha de ambas

a) La monocapa de azúbas adherida a las paredes de cada tubo fue desprendida por medio de un proceso de enfriamiento a 4°C en hielo picado por 7 minutos.

b) El medio de cultivo se decantó en botellas de plástico de 250 ml (6 botellas) y éstas se centrifugaron a 400 x g por 3 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada Damon/IEC Division.

c) Los paquetes celulares obtenidos de las botellas se dejaron en aproximadamente 30 ml del medio, estos se pasaron a tubos cónicos

¹ Esto se hizo con todas las proteínas trabajadas en esta tesis.

² La *E. histolytica* cepa HMI:IMSS es una cepa aislada de un paciente con amebiasis intestinal por Margarita de la Torre (Centro Médico Nacional). De la torre M., De la Hoz-Couturier R.L., y Sepúlveda B. 1974. Cultivos Axénicos de *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Med. México. 2 (suppl 1):165-172

de aproximadamente 40 ml y se centrifugaron a 320 x g por 3 minutos.

d) El resto de la monocapa de amibas se desprendió de los tubos por medio de un pipeteo constante utilizando aproximadamente 5 ml de ASF-A (amortiguador de fosfatos 15 mM, NaCl 175 mM, pH 7.2 -también llamado PBS por sus siglas en Inglés-) frio, centrifugando el contenido de los tubos a las mismas condiciones arriba anotadas, en tubos conicos de 40 ml.

e) Los paquetes obtenidos de los incisos c y d se lavaron otras dos veces con ASF-A.³

En el ultimo lavado se contaron las celulas por medio de un hematómetro utilizando la rejilla para leucocitos encontrandose aproximadamente 100 millones de amibas.

IV.1.1.2.1.2.-Obtención del extracto soluble de *E. histolytica*.

a) Los 100 millones de amibas se resuspendieron en 10 ml de una solución de ASF con triton x- 100 (Sigma) al 0.5% e Iodoacetamida (Calbiochem) 40mM, después del último lavado.

b) Se dejó actuar el detergente incubando la mezcla por 1 hr.

c) La mezcla se centrifugó a 80 000 x g por 1 hr a 5°C en una ultracentrifuga (Beckman modelo 1-5-500 con un rotor 60 ti) con el freno puesto, esto fue para descartar lo no disuelto por el detergente. Se obtuvieron aproximadamente 10 ml de extracto.

Este antígeno se alícuotó y se guardó a - 70°C previa determinación de proteína por medio del método del ácido bicinónico (BCA) obteniéndose una concentración de 4. Pese mg/ml.

Manual de métodos del Lab. 15. Biología celular CINVESTAV IPN

⁴ Ver apéndice A

Este extracto se utilizó como el antígeno acoplado a la columna de afinidad para que a él se unan los anticuerpos específicos.

IV.1.1.2.2.-ACOPLAMIENTO DE PROTEINA A SEFAROSA 4B

IV.1.1.2.2.1.-Acondicionamiento del Extracto soluble de *E. histolytica*

24.742 mg de proteína amibiana (2 viales de 2.5 ml cada uno) se descongelaron y colocaron en un tubo cónico plástico de aproximadamente 50 ml. Estos 5 ml de proteína se llevaron a 20 ml con un amortiguador de carbonatos 0.2 M y se comprobó que el pH final de la mezcla fuera de 9.5 (para lo cual se utilizó un papel pH).

IV.1.1.2.2.2.-Activación de la Sefarosa 4B con Bromuro de Cianógeno

- a) Siguiendo el método de March (1974)⁽⁴⁵⁾ se preparó un paquete de sefarosa 4 B (Farmacia Fine Chemicals) mezclando 10 ml de gel [Sefarosa 4B prelavada 2 veces por medio de centrifugación a 320 x g durante 3 minutos con 15 ml de carbonato de sodio (J.T Backer) 2 M] con 10 ml de carbonato de sodio 2 M en un tubo de 50 ml.
- b) El gel se resuspendió y se transfirió a un vaso de precipitados de 50 ml sometido en agua-hielo⁵ en agitación moderada en base al diagrama siguiente:

⁵ Si la activación se hace a 4°C se logra un acoplamiento de un 30% mayor a el logrado a temperatura ambiente (alrededor J. datos no publicados)

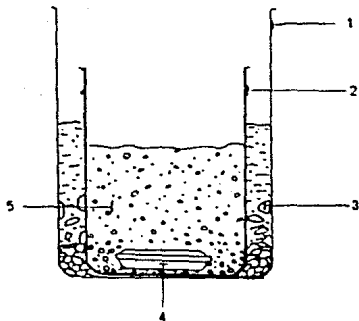


Fig 2.-Sistema de enfriamiento para la activación de sefarosa
 4-~~B~~, por medio de bromuro de cianógeno. 1.-Vaso de enfriamiento,
 2.-Vaso interno, 3.-Agua-hielo, 4.-barra magnética, 5.-Gel en
 activación

c) 1 ml de una mezcla de bromuro de cianógeno (Sigma) en acetonitrilo redestilado (J.T.Backer) a una concentración de 2 mg/ml (almacenado a -20°C), se vertió poco a poco en el sistema aumentando la velocidad de agitación durante 2 minutos.

d) Pasado este tiempo se transfirió inmediatamente la mezcla a un embudo de filtro poroso adaptado a un matraz Kitasato de 2 litros. el escape de la bomba tenía el drenaje orientado hacia el techo de una campana de extracción, para evitar la intoxicación del operador, por los vapores venenosos extraídos.

e) La sefarosa ya activada se lavó secuencialmente con las siguientes soluciones:

1) 200 ml de amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.5

2) 200 ml de agua desionizada.

3) 200 ml de amortiguador de carbonatos 0.2 M pH 9.5

En cada lavado se tuvo cuidado de que no se resecara el gel.

IV.1.1.2.2.3.-Acoplamiento de Proteína de amiba a la Sefarosa 4B Activada

Siguiendo el método modificado de Axén (1967)⁽⁷⁾ y March (1974)⁽⁸⁾ la masa de gel aún húmeda se transfirió a un recipiente plástico (un tubo cónico de 50 ml) donde se encontraban los 20 ml de proteína, a un pH de 9.5 en un amortiguador de carbonatos 0.21 M esta mezcla se dejó incubar por 24 hrs a 4°C.

IV.1.1.2.2.3.1.-Enmascaramiento de los grupos reactivos

a) Al término de la incubación acoplante, se adicionaron 2 ml de glicina 1.75 M en un amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.5 resuspendiendo el gel; a continuación se incubó la mezcla por 1.5 hrs a temperatura ambiente.

b) Terminada la incubación se procedió a centrifugar a 320 x g por 3 minutos y se recogió el sobrenadante guardando en refrigeración para cálculos posteriores.⁶

c) El material no acoplado se desprendió del gel lavándolo con las siguientes soluciones en forma secuencial por medio del embudo de filtro poroso.

1) 400 ml de amortiguador de acetatos 0.1 M (Baker analyzed) pH 4.5 con NaCl (Baker) 0.5 M

2) 400 ml de Urea (Biorad) 2 M conteniendo 0.5 M de NaCl

⁶ Al determinar la concentración de proteína de cada uno de los sobrenadantes fue posible determinar el grado de acoplamiento.

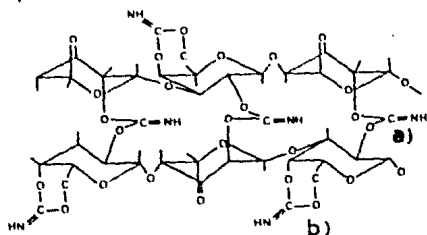
3) 400 ml de amortiguador de carbonatos 0.1 M con NaCl

0.5 M pH 10

4) 400 ml de ASF

d) La conjugación se llevo a termino en el inciso c y el gel acoplado a la proteína respectiva se guardó por separado en tubos conicos plasticos en presencia de azida de sodio al 0.1% p/v en frio (4°C) para evitar contaminación y fragmentación proteolítica de la proteína acoplada. (7,45)

A)



Tomado de ref 1

B)

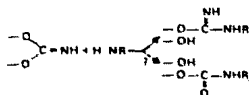


Fig 3-A -Estructura hipotética de la sefrosa despues de la activación con CNBr. Notar La presencia de imidocarbonatos acíclicos

B.-Reacción de acoplamiento entre los grupos amino primarios y los imidocarbonatos cíclicos

IV.1.1.2.3. -INMUNOPURIFICACION DEL SUERO DE CONEJO ANTI *E.histolytica* POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

a) Se montó una columna de 8 cm de altura por 1.5 cm de diámetro con el gel de sefarcosa 4B-extracto de amiba; se dejó sedimentar.

b) Se lavó la columna con 25 ml de ASF para quitar los restos de azida de sodio.

Para evitar la acción de las proteasas de la amiba que pudieran activarse con el lavado, se corrió también la columna con 50 ml de Iodoacetamida 2 mM en PBS.

c) 80 ml de suero de conejo anti *E.histolytica* acondicionado en el punto IV .1.1.1 se centrifugaron a 11 180 x g en un rotor 60 ti por 45 minutos y se pasaron por la columna reciclando 2 veces el suero.

d) Se lavó la columna con 70 ml de ASF recogiendo el volumen de lavado en alícuotas de 2 ml por medio de un colector de fracciones GILSON; determinando el punto en el cual se había removido la totalidad de los contaminantes por el método descrito en el apéndice B

e) Una vez que ya no había proteína en el volumen de lavado se procedió a desprender los anticuerpos específicos unidos a la columna por medio de un cambio de pH. Para esto se eluyó la columna con glicina 0.2 M pH 2.5⁽¹³⁾ recogiendo alícuotas de 2 ml del volumen de elución en tubos por medio del colector de fracciones, en cada tubo había 285 µl de un amortiguador de Tris-HCl 1 M [Tris (Hidroximetil)amonio metano] (Calbiochem) pH 8, el cual neutralizaba a la glicina llevando a la mezcla a un pH de 7.5⁷

⁷ Las inmunoglobulinas son más estables en medio alcalino. En medio ácido son estables por muy poco tiempo.

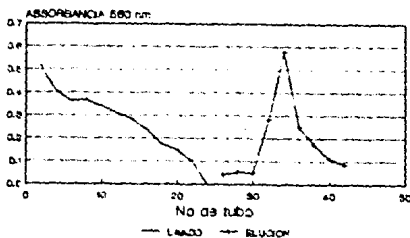
Se observó el picc de proteínas por el metodo arriba descrito obteniendose a 5 ml de anticuerpo de conejo anti *E. histolytica* especifico. la figura 4 es un cromatograma tipico de este proceso.

f) 4.5 ml de este anticuerpo se dializaron en 500 ml de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 8 por 24 hrs. para una posterior biotinilación

g) El anticuerpo restante se dializo en 500 ml de ASF con cambio cada 24 hrs (un total de 4 cambios de ASF).

El anticuerpo del inciso g se guar- do a -70°C previa determinación de proteína por el metodo del acido bicinonínico obteniendose una concentración de 574.549 $\mu\text{g/ml}$

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD Ac DE CONEJO ANTI AMBA



Lavado de la columna y Elucion del Ac de conejo anti *E. histolytica*

Metodo BCA

Fig 4. Cromatograma tipico de la elución de un Ac por cromatografía de afinidad. En la figura aparece la zona de lavado de los anticuerpos unidos inespecificamente y el segundo marca la elución del ac especifico por cambios de pH. Este cromatograma se observó por el metodo de BCA.

B Ver apendice A

IV.1.1.3. -ACOPLAMIENTO DEL AC DE CONEJO ANTI *E.histolytica* A BIOTINA

IV.1.1.3.1. -BIOTINILACION

a) Como ya se indicó en el inciso f del punto IV.1.1.2.3, 4.5 ml de este anticuerpo se dializaron en carbonato de sodio 0.1M pH 8.0

b) Se pesaron 1.1491 mg del reactivo de biotilación ENZOTIN (éster de biotin N-hidroxi succinamida) y se disolvieron en 1 ml de Dimetil sulfóxido (DMSO Baker analyzed). Esta solución se disolvió 1:2 en DMSO para obtener una concentración final de 0.57 mg/ml la cual es igual a la del anticuerpo de conejo contra amiba.

c) 540 µl de la solución de ENZOTIN en DMSO (0.57 mg/ml) se adicionaron a 4.5 ml del Ac de conejo contra *E.histolytica* (es decir en una relación de 0.12 ml de la solución de ENZOTIN por cada ml de proteína), esta mezcla se homogeneizó y se incubó la mezcla toda la noche a 4°C

d) La mezcla se dializó en 500 ml de ASF con 3 cambios en 8 hrs para después dejar dializar en 2 L de ASF por 2 días.

e) el dializado se ultracentrifugó a 80 500 x g por 30 minutos en un rotor 65 14. (73,24)

El anticuerpo se alícuotó previa determinación de proteína (apéndice A) por el método de BCA obteniéndose 476.83 µg/ml, conservándose a -70°C

IV.1.1.3.2. -DETERMINACION DEL GRADO DE BIOTINILACION POR DOT BLOT EN PAPEL DE NITROCELULOSA

a) Un papel de nitrocelulosa de 11 x 8 cm se remojó en agua bidestilada. El papel se montó en un aparato par Dot Blot, el cual podía ser drenado por vacío.

b) diluciones cuádruples seriadas se pusieron en el aparato (50 µl

por pozo) comenzando desde 1:500 hasta llegar a 1:512 000. Marcas asimétricas de tinta china diluida 1:2 en ASF se pusieron como referencia. Por medio del vacío se drenó el aparato.

c) Cada pozo, los marcados con la tinta china y los que contenían el anticuerpo diluido, se lavaron con 200 µl de ASF. Drenándose cada vez el aparato.

d) El papel de nitrocelulosa, una vez removido cuidadosamente de la placa, se enjuagó en agua, lavándose por 3 ocasiones.

e) El papel se saturó con Blotto al 5% (leche descremada al 5% en ASF, EDTA 3 mM y azida de sodio al 0.1%) dejándose incubar por 1 hr a 37°C.

f) Pasado este tiempo se lavo con agua el papel, haciéndose 3 lavados más con ASF-Tween 20 al 0.05 %, decantándose rápidamente cada vez el recipiente.

El papel se puso en un vaso con ASF-tween 20 al 0.05%, el vaso contenía una rejilla, la cual separaba el papel de una barra magnética contenida en el fondo del sistema. Este sistema se puso en agitación por 15 minutos.

g) Al terminar este tiempo se puso en contacto el papel con 40 ml de una dilución de 1/2500 de estreptavidina peroxidasa (ZYMED) por 40 minutos a 37°C.

h) El papel se lavo una vez más con ASF-Tween al 0.05% poniéndose en agitación, en el sistema anteriormente descrito, por 15 minutos.

i) Durante este tiempo se preparó la solución siguiente, la cual contenía el sustrato de revelado:

25 µg de tetraclorhidrato de 3,3' diamino benzidina (DAB sigma), se pusieron a disolver en 45 ml de agua bidestilada con agitación, obteniéndose un pH aproximadamente de 3; éste se ajustó a un pH de 11 con NaOH 1N con el fin de llevar la solución a un pH de 7.5, una vez hecho esto se le añadió 50 µl de H₂O₂ (es decir 1 µl de peróxido de hidrógeno por ml de solución de revelado).

j) El papel ya lavado se puso en un recipiente plástico para fotografía (aproximadamente 50 ml de volumen), el cual contenía la mezcla de DAB. Se dejó desarrollar el color de los pozos por 15 min con agitación constante; en este momento se pusieron 3 ml de CoCl_2 al 1%⁹ y se dejó incubar por otros 5 minutos más.

k) El papel se lavó con agua corriente, se secó utilizando papel secante y aire caliente seco.¹⁰

Una biotiniación razonable resulta en una mancha positiva a una concentración menor de 4 ng de proteína biotiniada.

IV.1.1.4. - TITULACION DEL ANTICUERPO DE CONEJO ANTI *E. histolytica* MARCADO CON BIOTINA.

Esta titulación se hizo siguiendo el protocolo general del método de ELISA descrito en el apéndice C, con las siguientes correcciones:

a) La placa se forró con 10 $\mu\text{g/ml}$ del Ac de conejo anti *E. histolytica* HMI sin marcar como anticuerpo de captura (50 μl), exceptuando la fila H, donde se puso ASF.

b) Como antígeno se usó 5 $\mu\text{g/ml}$ del extracto soluble de *E. histolytica* preparado en el punto IV.1.1.2.2. (50 μl) exceptuando filas C y D, en donde se utilizó ASF.

c) Como segundo ligando se pusieron diluciones dobles seriadas del Ac de conejo anti amiba marcado con biotina, para esto se comenzó desde 20 $\mu\text{g/ml}$ hasta llegar a 9.7×10^3 $\mu\text{g/ml}$. Esto se hizo exceptuando

⁹ Este reactivo fija la coloración de las manchas al secarse el papel.

¹⁰ Precauciones: El DAB es carcinogenico. Todo el material en contacto con esta mezcla debe ser sumergido en una solución de hipoclorito de sodio comercial por 1 hr con el fin de neutralizarlo.

¹¹ Dr Calderón. (Manuscrito no publicado).

la fila E.

d) Para observar la presencia del Ac de conejo anti *E. histolytica* biotinilado se agregó 50 μ l de estreptavidina-peroxidasa a una dilución de 1/2500 revelándose la reacción con ABTS.

Como blanco se utilizó la línea de pozos que no contenía Ac de conejo biotinilado. El experimento se hizo por triplicado.

El título se consideró en estas condiciones como la dilución de anticuerpo que daba una absorbancia cercana a: $1.0^{(100)}$

IV.1.1.5. - DETERMINACION DE LA CANTIDAD MINIMA DE Ag DE *E. histolytica* RECONOCIDA POR EL Ac DE CONEJO CONTRA AMIBA MARCADO CON BIOTINA.

En este ensayo se utilizó el método general de ELISA para ver la sensibilidad del anticuerpo.

Los cambios al protocolo general del ELISA fueron los sig:

a) La placa se forró con 10 μ g/ml del Ac de conejo anti *E. histolytica* como anticuerpo de captura.

b) Como antígeno se utilizó el extracto soluble de amiba (filas A y B), Albúmina (filas E y F), en diluciones cuádruples seriadas comenzando desde 20 μ g/ml hasta terminar con 4.768×10^{-6} μ g/ml. En las filas C y D se puso ASF y en la fila H, pozos (1-6) 6 μ g/ml de extracto soluble de amiba y en los pozos 7-12, 6 μ g/ml de albúmina.

c) El segundo ligando consistió en el Ac de conejo anti *E. histolytica* marcado con biotina a una concentración de 0.3125 μ g/ml exceptuando la fila H.

d) La presencia del Ac biotinilado se demostró usando estreptavidina-Po a una concentración de 1/2500.

e) como blanco se utilizó la fila H.¹²

¹² La cantidad mínima reconocida por este anticuerpo fue aquella

IV.1.2. -ELIMINACION DE INESPECIFICIDADES EN EL
Ac DE CONEJO ANTI *E.histolytica* Y PRUEBA DE
SU ACTIVIDAD

IV.1.2.1. -RECONOCIMIENTO Y ELIMINACION DE LAS POSIBLES
INESPECIFICIDADES DEL ANTICUERPO DE CONEJO ANTI *E.histolytica*

En el punto IV.1.1.4 (el cual describe la titulación de este anticuerpo) se probó la reactividad cruzada de este anticuerpo contra el contaminante más común del Ag de amiba, el suero bovino. En este punto se prueba la proteína más abundante de suero bovino, la albúmina. (30)

IV.1.2.1.1. -DETERMINACION DEL PATRON DE RECONOCIMIENTO DEL Ac DE
CONEJO CONTRA *E.histolytica* MARCADO CON BIOTINA SOBRE Ag DE
E.histolytica INMUNOTRANSFERIDO A PAPEL DE NITROCELULOSA.

23 tiras de papel de nitrocelulosa con 1.2 mg de extracto soluble de *E.histolytica* en bandas proteicas adsorbidas electrostáticamente en este laboratorio (para más detalles ver ref (57)), se pusieron en una placa para inmunodetección y se saturaron los sitios activos remanentes con Blotto al 5% (Leche descremada Sveltex al 5%, EDTA 3mM, azida de sodio 0.1%), a razón de 1 ml/tira, dejándose incubar por 1 hr a 37°C.

b) Como primer ligando se puso:

Tira 1. -ASF 1 ml/tira

Tira 2 y 3. -Ac de conejo anti *E.histolytica*, biotinilado a una concentración de 1.25 µg/ml y a razón de 1 ml/tira, las tiras se incubaron por 40 minutos a 37°C.

c) Como segundo ligando se utilizó estreptavidina-Po 1/2500 (1 ml/tira) incubando por 40 minutos a 37°C.

dilución del Ag donde todavía daba una absorbancia ≥ 0.3

d) La reacción se reveló usando DAB (la preparación se enuncia en el inciso i del punto IV.1.1.3.2.) a razón de 1 ml/canal dejandose reaccionar la mezcla por 25 minutos.

e) La reacción se paro sumergiendo las tiras en agua para enjuagarlas. Una vez hecho estos se pusieron a secar usando papel secante y aire caliente.

Estas tiras se compararon con otras tiras del mismo lote, las cuales fueron teñidas con azul de Coomasie al 0.1% para ver el patrón electroforético del extracto soluble de amiba.

Tinción:

1) 2 tiras ¹³ se lavaron con agua corriente.

2) Se sumergieron en una solución de azul de Coomasie (R-250) al 0.1% en MeOH (Baker) al 50% por 10 min.

3) Una vez pasado el tiempo se destiñeron las tiras con metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 7 minutos.

4) Las tiras se colocaron en papel secante y se secaron con aire caliente.

Utilizando marcadores de peso molecular se pudo trazar un gráfico de peso molecular contra R_f para determinar los pesos moleculares de las proteínas reconocidas por f_1^1 Ac de conejo contra E. hist.

¹³ Estas tiras estaban almacenadas en PBS con azida de sodio al 0.1%

¹⁴ Durante el corrimiento electroforético siempre se corren marcadores de peso molecular, en este caso preteñidos (BIORAD), para determinar los pesos moleculares de las proteínas de amiba.

IV.1.2.2. -PRUEBA DE LA ACTIVIDAD DEL AC DE CONEJO ANTI
E. histolytica

DETECCION DE AG AMIBIANO CIRCULANTE EN EL SUEPO DE
PACIENTES CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO

Material biológico.-Se conto con 14 sueros de pacientes con absceso hepatico amibiano activo, con datos clinicos de amibiasis y gammagrafia positiva de absceso hepatico.¹⁵ Los sueros de estos enfermos se usaron como fuente de antigeno. El nivel de anticuerpos circulantes contra *E. histolytica* fue determinado previamente en el laboratorio.⁵² Igual modo se conto con 16 sueros de personas sanas sin datos clinicos de la enfermedad, obtenidos del banco de sangre del hospital La Raza IMSS, Mexico DF y del laboratorio de Analisis Clinicos, FES-C UNAM.

Protocolo de ligandos.-Los ligandos se pusieron siguiendo el orden dado en la tabla 7.

¹⁵ Obtenidos por el M. en C. Miguel Cruz del Hospital La RAZA, IMSS, Mexico D.F.

TABLA 7

**PROTOCOLO DE UNION EN BUSQUEDA DE AG AMBIANO
SERICO**

No	Ligando	Identidad ligando	Concentracion
	Ac captura	Ac conejo vs E.Histolytica	10 µg/ml
1 ^{er}	ligando	Suero de paciente	1/10
2 ^o	ligando	Ac conejo vs E.Histolytica marcado con biotina	0.3125 µg/ml
3 ^{er}	ligando	estreptavidina-Po	1:2500

El sistema se hizo siguiendo el metodo general de ELISA usando la tecnica de "doble sandwich".

Condiciones generales del ensayo

a) Cada suero de paciente se ensayo por cuadruplicado.

b) En cada caja se hizo una curva con Ag soluble de Amba como control positivo; usando diluciones de : 20, 5, 1.25 y 0.3125 µg/ml en vez del suero de paciente.

c) La fila H no se incube con Ac de conejo anti E.Histolytica marcado con biotina el cual se utilizo como blanco.

d) Siguiendo este protocolo en cada caja se colocaron 18 sueros de pacientes y un suero normal. Cada caja se hizo por duplicado espaciadas con un dia de diferencia entre cada experimento.

La figura 5 nos muestra una ejemplo de este ensayo.

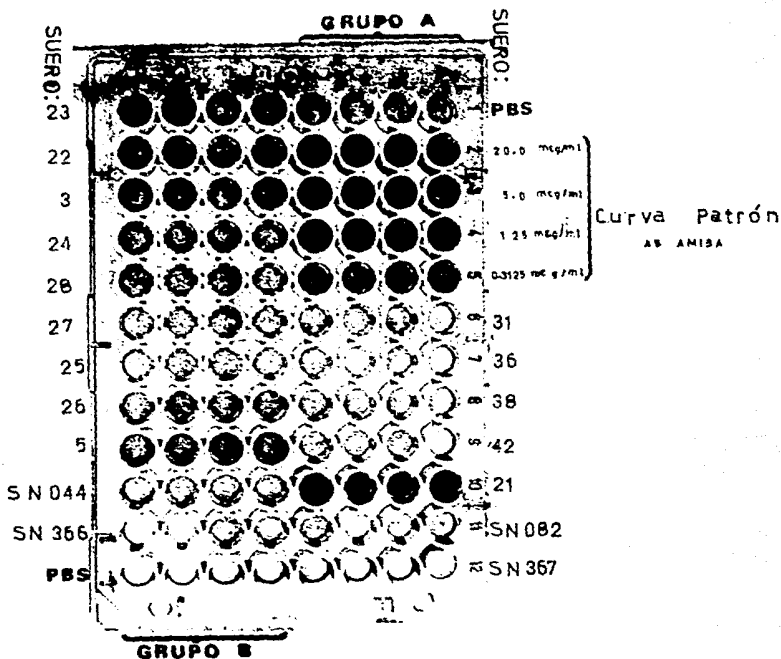


FIG 5. -Protocolo para la detección de Ag ambiente circulante en pacientes con ARA.

De este modo se trata de ejemplificar una determinación de este antígeno por ELISA. Los sueros se ensayaron por cuadruplicado, siendo el grupo A una fila con estos sueros al igual que el grupo B, el cual es otra serie de sueros; como control positivo se usó una curva patrón de Ag ambiente y como control negativo sueros normales y PBS.

IV.2.-ANTICUERPO DE CARNERO ANTI IgG HUMANA

IV.2.1.-OBTENCION DEL ANTICUERPO.

IV.2.1.1.-ACONDICIONAMIENTO DEL SUERO DE CARNERO ANTI IgG HUMANA.

Este anticuerpo se inmunopurificó en 1982, obteniéndose un Ac de carnero anti IgG humana con una concentración de 18 mg/ml⁽⁰⁴⁾. Entonces para su uso se descongelaron y juntaron 4 viales de 500 µl del anticuerpo arriba mencionado.

IV.2.1.2.-INMUNOPURIFICACION DEL Ac DE CARNERO ANTI IgG HUMANA.

IV.2.1.2.1.-OBTENCION DEL ANTIGENO PARA LA CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

IV.2.1.2.1.1.-Acondicionamiento del suero de ratón.

1) 34 ml de un lote de inmunoglobulinas de ratón fraccionadas por sulfato de amonio saturado a una concentración final del 50%, fueron dializadas en 450 ml de un amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.3, llevándose a cabo 2 cambios de éste durante 24 hrs. La membrana de diálisis (Arthur Thomas) usada retenía un rango de entre 12×10^3 y 14×10^3 de peso molecular.

2) Las inmunoglobulinas de ratón se centrifugaron a 80 500 x g por 30 minutos en una ultracentrifuga Beckman, usando un rotor 50 14.

A este sobrenadante¹⁵ le determinó proteína por el método de FOLIN¹⁵ obteniéndose 11.1200 mg/ml. Considerando que teníamos aprox. 30 ml, se obtuvo 333.658 mg de proteína.

IV.2.1.2.1.2.-Obtención de las IgG de ratón por cromatografía de intercambio iónico.

a) Se preparó una fase sólida para CIO consistente en DE-52 Whatman preactivada (Dietil-amino util celulosa), hidratando las esferas en agua destilada y deaerandolas en vacío por 30 minutos.

b) Se montó una columna con estas esferas en un tampon de fosfatos 10 mM pH 7.3 y se lavó la columna con 20 ml de este amortiguador.

c) 30 ml de las Ig's de ratón se corrieron tomando alícuotas de aproximadamente 4 ml (equivalente a 80 gotas/tubo) utilizando un colector de fracciones GILSON.

Aproximadamente en el tubo No 11 se absorbio todo el suero, el restante se eluyó con 3 ml del amortiguador de fosfatos 10 mM.

d) la columna se lavó con 18 ml del buffer de fosfatos 10 mM.

e) Las IgG de ratón fijadas a la DE-52 se eluyeron utilizando una alta concentración de sales por medio de 50 ml de NaCl 0.2 M en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0⁽¹⁷⁾

Cada pico de proteínas se determinó haciendo una prueba rápida de detección de proteínas utilizando el método descrito en el apéndice B.

f) De este modo se obtuvieron aproximadamente 8 ml de IgG de ratón purificadas, las cuales se guardaron a - 70°C para su posterior uso.

La concentración de proteína fue determinada por medio del método de BCA¹, obteniendose una concentración de 34.9150 mg/ml.

Estas Ig's se utilizaron acopladas a una columna, para la cromatografía de afinidad.

¹⁷ Ver apéndice A

IV.2.1.2.2.-ACOPLAMIENTO DE PROTEINA A SEFAROSA 4B

IV.2.1.2.2.1.-Acondicionamiento de las IgG de ratón.

A 52.3719 mg de IgG de ratón purificada por DE-52 (1.5 ml) se les hizo el tratamiento arriba mencionado en el punto IV.1.1.2.2.1

IV.2.1.2.2.2.-Activación de la sefarosa 4B con bromuro de cianógeno y acoplamiento de la proteína a la sefarosa.

Estos pasos se siguieron en base a lo expuesto en los puntos IV.1.1.2.2.2 y IV.1.1.2.2.3, con excepción de que la glicina 1.75 M utilizada para el enmascaramiento de los grupos reactivos se dejó en contacto con la mezcla de sefarosa 4B e IgG de ratón durante 2.5 hrs a temperatura ambiente.

IV.2.1.2.3.-BLOQUEO DE LAS REACCIONES INESPECIFICAS CONTRA IgG DE RATON DEL AC DE CARNEIRO ANTI IgG HUMANA POR MEDIO DE CROMATOGRAFIA DE AFINDIDAD

a) Para este experimento se utilizo una columna de sefarosa 4B-acoplada a IgG de ratón de las dimensiones usadas para la columna del punto anterior, dejandose 1 hr para que sedimentara. Esta columna fue lavada con 15 ml de ASF.

b) 1.5 ml del AC de carnero purificado por inmuoafinidad¹⁰⁰ (aproximadamente 20 mg) se pasaron por la columna, reciclandose 3 veces en la columna; dejandose consumir el suero cada vez.

c) Se volvió a pasar el anticuerpo recogiendo fracciones de 1 ml por tubo (el equivalente a 20 gotas/tubo), al consumirse el suero se corrió la columna con 3 ml más de ASF.

d) La columna se eluyó con 25 ml de ASF observando el pico de proteínas como se explicó anteriormente (incisu e del punto IV.1.1.2.3).

e) Un pool de aproximadamente 12 ml de anticuerpo se ultracentrifugó a 80 500 x g en un rotor 65 ti por 30 min.

El sobrenadante se alícuota y se guardó a -70°C previa determinación de proteínas por el método de BCA obteniéndose una concentración de 7.6635 mg/ml.

f) La fracción retenida en la columna fue eluida con glicina 0.2 M pH 7.2 utilizándose aproximadamente 60 ml del amortiguador para tal efecto. Con esto la columna quedó lista para volverse a usar guardándose a 4°C en ASF con 0.1% de azida de sodio. (13)

IV.2.1.3. -ACOPAMIENTO DEL ANTICUERPO DE CARNERO ANTI IgG HUMANA A UN MARCADOR

IV.2.1.3.1. -ACOPAMIENTO DEL AC DE CARNERO CONTRA IgG HUMANA A PEROXIDASA DE RÁBANO

Para tal efecto se utilizó el método de 2 pasos con glutaraldehído, en el cual primero se acopla el glutaraldehído a la peroxidasa de rábano pura (HRP), para después purificar la mezcla de HRP-glutaraldehído y añadirse a la solución de anticuerpo.

a) 10 mg de HRP (RZ=3 Calbiochem) se disolvieron en 0.2 ml de un amortiguador de fosfatos 0.1M pH 6.8 con 1.25% de glutaraldehído, dejándose en reposo por 18 hrs a temperatura ambiente.

b) La solución se filtró en una columna de sefadex G 25 columna fina (Sigma) de 0.8 x 18 cm, la cual estaba equilibrada con NaCl 0.15M, con el fin de remover el exceso de glutaraldehído.

c) Las fracciones conteniendo la HRP activada (de color café) se juntaron obteniéndose 800 µl de volumen; esta solución se llevó a 1 ml con un tampón de carbonatos 0.1M pH 9.5, para obtener una concentración final de 10 µg/ml.

Esta solución se dializó con un buffer de carbonatos 0.1M pH 9.5

d) 1 ml del anticuerpo de carnero anti IgG humana (5 mg/ml) se dializó en NaCl 0.15M, el cual tenía un pH entre 9.0-9.5

e) Se mezclaron las soluciones de los incisos c y d, dejándose por 24 hrs a 4°C.

f) 0.1 ml de lisina 0.2M (Sigma) se agregaron, dejándose incubar la mezcla por otras 2 hrs a 4°C.

g) La solución resultante se dializó en ASF por 24 hrs. ^(40.6.10)

El anticuerpo marcado se alícuotó en tubos plásticos de 0.1 ml con 50% de sulfato de amonio saturado, guardándose en un frasco obscuro a 4°C, tal como lo marca la referencia, previa determinación de proteína por el método de BCA obteniéndose una concentración de 4.1700 mg/ml.

IV.2.1.3.2.-ACOPLAMIENTO DEL AC DE CARNERO ANTI IgG HUMANA A BIOTINA

5 ml del anticuerpo a una concentración de 5 mg/ml se dializaron en NaHCO₃ 0.1M pH = 8 durante una noche en frío.

IV.2.1.3.2.1.-Biotinilación

La biotinilación se siguió como lo indica el punto IV.1.1.3.1 utilizando 3 mg/600µl de ENZOTIN en DMSO, obteniéndose un anticuerpo de carnero biotinilado con una concentración de 5.3833 mg/ml.

IV.2.1.3.1.2.-Determinación del grado de biotinilación por Dot Blot en papel de nitrocelulosa

Para tal efecto se utilizó el protocolo marcado en el punto IV.1.1.3.2, poniéndose las siguientes cantidades del anticuerpo en los poros: 1, 2, 4, 8, 16 y 32 ng de proteína para la determinación.

IV.2.1.4. -TITULACION DE LOS ANTICUERPOS ACOPLADOS A UN MARCADOR

IV.2.1.4.1. -TITULACION DEL ANTICUERPO DE CARNERO ANTI IgG HUMANA MARCADO CON PEROXIDASA

Se determinó el título de este anticuerpo usando el método de ELISA con las siguientes correcciones:

a) La placa fue forrada con 5 µg/ml de IgG de humano (purificada por una columna de intercambio iónico en 1988,¹⁸ en este laboratorio) usando 50 µl por pozo. La placa se forró exceptuando la fila E. en donde se puso ASF.

b) Como primer ligando se pusieron diluciones dobles seriadas del Ac de carnero anti IgG humana marcado con peroxidasa¹⁸, comenzando de una dilución de 1/200 hasta llegar a la de 1/20 4800. Esto se hizo con excepción de las filas C y D.

c) La reacción se reveló con ABTS usando como blanco los pozos de las filas C y D.

IV.2.1.4.2. -TITULACION DEL AC DE CARNERO ANTI IgG HUMANA MARCADO CON BIOTINA

Esta titulación siguió el protocolo descrito en el punto IV.2.1.4.1. con las siguientes excepciones.

a) Hubo una fila más la cual se forró con IgG humana (fila F)

b) En vez del Ac de carnero anti IgG humana marcado con peroxidasa se usó el marcado con biotina.

c) En este caso hubo un segundo ligando el cual consistió en estreptavidina-peroxidasa a una dilución de 1/2500, exceptuando la fila F

¹⁸ Para usar este anticuerpo peroxidado fue necesario resuspenderlo a su volumen original en PBS, después de desechar el SAS al 50% por ultracentrifugación a $472 \times g$ en una microfuga Ependorf 500. (49)

IV.2.1.5. -DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DE LOS ANTICUERPOS

IV.2.1.5.1. -DETERMINACION DE LA CANTIDAD MEDIANA DE IgG HUMANA RECONOCIDO POR EL AC DE CARNERO ANTI IgG HUMANA MARCADO CON BIOTINA

El ensayo siguió los lineamientos generales del ensayo de ELISA. A continuación se marcan los cambios hechos a este protocolo en esta determinación:

a) Las filas A y B de la placa se forraron con IgG humana (con las características expuestas en el inciso a del punto IV.1.1.5) en diluciones dobles seriadas, comenzando desde 20 $\mu\text{g/ml}$ para terminar con 0.78×10^{-3} $\mu\text{g/ml}$. En las filas C y D se utilizó ASF.

b) La placa se saturó con glicina al 10% en ASF en vez de gelatina al 0.5% en ASF.

c) Como primer ligando se usó el anticuerpo de carnero contra IgG humana biotinilado a una dilución de 1/20 000 preincubado con 10% de suero de ratón.

d) Para revelar la presencia del Ac de carnero biotinilado se utilizó la estreptavidina-Po (ZYMED) a una dilución de 1/2 500.

e) Como blanco se utilizaron las filas C y D.¹⁹

La figura 6 muestra una determinación típica.

¹⁹ Idem

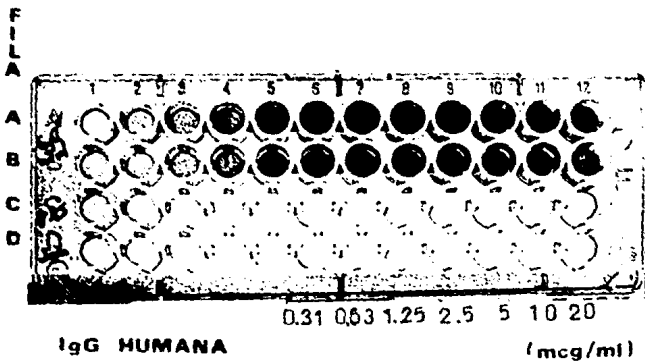


FIG 6.-Protocolo de identificación de la sensibilidad del anticuerpo de carnero anti IgG humana marcado con biotina. Este es un ejemplo de la determinación de la sensibilidad de este anticuerpo por medio de ELISA. Como blanco se utilizaron las filas C y D las cuales carecían del anticuerpo biotinizado.

IV.2.1.5.2. -DETERMINACION DE LA CANTIDAD MINIMA DE IgG HUMANA RECONOCIDA POR EL Ac DE CARNERO ANTI IgG HUMANA MARCADO CON PEROXIDASA

Los cambios operados en el protocolo general de ELISA seguido son los siguientes:

a) Las filas A y B de la placa se ferraron con IgG humana (ver características dadas en el inciso a del punto IV.1.1.5.) en diluciones dobles seriadas partiendo de 5 $\mu\text{g/ml}$ hasta llegar a 0.00976 $\mu\text{g/ml}$. En las filas C y D se utilizó ASF.

b) El ligando fue el Ac de carnero contra IgG humana peroxidado a una dilución de 1/2000.

c) como blanco se utilizaron las filas C y D.²⁰

IV.2.2. - ELIMINACION DE POSIBLES INESPECIFICIDADES EN LOS INMUNOREACTIVOS Y PRUEBA DE SU ACTIVIDAD

IV.2.2.1. - RECONOCIMIENTO Y ELIMINACION DE LAS POSIBLES INESPECIFICIDADES DE LOS INMUNOREACTIVOS.

IV.2.2.1.1. - Ac DE CARNERO ANTI IgG DE HUMANO MARCADO CON PEROXIDASA

IV.2.2.1.1.1. - Determinación de la dilución de suero normal de humano con el menor fondo inespecífico (o background) ante este anticuerpo.

La determinación se hizo siguiendo el método general de ELISA con las siguientes condiciones:

a) La caja no se forró con ningún antígeno, si no que solo se forró con gelatina al 0.5% en ASF a 4°C por toda una noche.

b) Como primer ligando se usaron 9 diferentes sueros normales de humano a las siguientes diluciones: concentrado, 1/25, 1/125, y 1/500 por duplicado.

En la columna 1 como antígeno se usó ASF.

c) Como segundo ligando se usó Ac de carnero anti IgG humana marcado con peroxidasa a una dilución de 1/2000, exceptuando la fila H.

d) Como blanco se usó la fila H.

La dilución buscada fue aquella en la que se tuvo la mayor concentración de suero humano pero que en el sistema no diera una absorbancia >0.2

²⁰ Para mayor detalle de los cambios operados entre el protocolo de determinación de la sensibilidad del Ac de carnero peroxidado y el marcado con biotina ver RESULTADOS

IV.2.2.1.2.-Ac DE CARNEIRO ANTI IgG DE HUMANO MARCADO CON BIOTINA

IV.2.2.1.2.1.-Determinación de la dilución de suero normal de humano con el menor fondo inespecífico (o background) ante este anticuerpo.

La determinación se hizo siguiendo el método marcado en el punto en el punto IV.2.2.1.1.1 (con excepción de que en el inciso c se uso el Ac de carnero anti IgG de humano marcado con biotina a una dilución de 1/20 000 y que existe un inciso d) el cual marca el uso de estreptavidina-Po para revelar la presencia del Ac biotinilado.

IV.2.2.1.2.1.-Busqueda de reacciones inespecificas del Ac de carnero biotinilado contra IgG de ratón.

Esta determinación se hizo también siguiendo el protocolo de ELISA con las siguientes excepciones:

a) Las filas A,C,y H se forraron con 10 µg/ml de un anticuerpo de captura que consistio en un anticuerpo monoclonal de ratón contra el receptor de INF y llamado GIR-208 (preparado en el laboratorio).

b) La placa se saturó con glicina al 10% en ASF por 1 hr a 37°C

c) Como primer ligando se puso:

Columnas 1,2,3,4,5 y 6 ASF.

Columnas 7,8,9,10,11 y 12 extracto de membrana plasmática de placenta humana, como fuente de receptor de INF γ, diluido 1/30.
Incubando por 40 min. a 37°C

d) El 2º ligando consistió en:

Columnas 1,2,3,7,8, y 9 ASF.

Columnas 4,5,6,10,11 y 12 suero humano diluido 1/500
(preincubado por 1 hr a temperatura ambiente con suero normal de ratón a una dilución final de 1/10)

Estos ligandos se incubaron por 1 hr a 37°C.

e) El Ac de carnero contra IgG de humano Biotinilado se puso en 2 modalidades:

1) Diluido 1:20 000 en las filas A y B

2) Diluido 1:20 000 preincubado con suero normal de raton (Se incubó 1 hr a temperatura ambiente diluido 1:4 000 con 10% de suero normal de raton (2 mg/ml de proteina aproximadamente)), en las filas C y D

Incubandose 40 min. a 37°C.

f) Para revelar la presencia del Ac biotinilado se revelo con estreptavidina-Peroxidasa 1:2500 por 40 min a 37°C.

g) Como blanco se uso la fila H, la cual no tenia Ac de carnero biotinilado.

IV.2.2.2. -PRUEBA DE LA ACTIVIDAD DEL ANTICUERPO DE CARNERO ANTI IgG HUMANA ACOPLADO A BIOTINA.

BUQUEDA DE UN Ac CONTRA EL RECEPTOR DE INF Y EN EL SUERO DE PACIENTES CON LUPUS ERMATOSOSO SISTEMICO

Material biológico.-Para el experimento se conto con 40 sueros de pacientes con SLE provenientes de la coleccion del Dr Donato Alarcon, del Departamento de Inmunologia del Instituto de Nutricion "Salvador Subiran" en 1989.

Los sueros se usaron como fuente del Ac contra receptor de INF y, del mismo modo se conto con 41 sueros normales de personas sin datos clinicos de la enfermedad en cuestion (tal como se indica en el punto IV.1.2.2)

Protocolo de los ligandos.-Los ligandos se pusieron siguiendo el ordenamiento expuesto en la tabla 6

TABLA B

PROTOCOLO DE UNION EN BUSQUEDA DE UN AC vs RECEPTOR DE INF Γ			
No ligando	Identidad ligando	concentraci3n	tiempo incubaci3n
Ac captura	Ac monoclonal de rat3n GIR 208	5 μ g/ml	2 hrs 37°C o 18 hrs a 4°C
1 ^{er} ligando	Membrana plasmatica de placenta humana como fuente de rINF γ	1/30	40 min 37°C
2 ^o ligando	Suero de paciente	1/50, 1/100, 1/500.	1 hr a 37°C
3 ^{er} ligando	Ac de carnero anti IgG humana-biotinilado	1/20 000	40 min 37°C
4 ^o ligando	estreptavidina-Po	1/2500	40 min 37°C

El ensayo sigui3 con el m3todo general de ELISA.²¹

Condiciones del ensayo. -

a) Despues de forrar la placa con el Ac monoclonal GIR 208, esta se satura con glicina al 10% en ASF.

b) El Ac de captura fungio como un m3todo de purificaci3n, ya que por su especificidad separ3 el receptor de INF γ y de los restos celulares de la placenta.

c) Cada ligando se diluy3 en ASF-Tween 20 al 0.05%-glicina al 10%.

d) Como denota el ensayo, el suero de paciente se corri3 a 3 diluciones diferentes: cada dilucion se hizo por triplicado, pudiendose correr 3 sueros de paciente y un suero normal por caja.

²¹ Ap3ndice c.

e) El Ac de carnero anti IgG de humano se preincubó a temperatura ambiente en una dilución de 1/4 000 con 10% de suero normal de ratón (como dilución final), por una hora; al terminar la preincubación se diluyó el Ac en una proporción de 1/5 de tal modo que al final obtuvimos un Ac diluido a 1/20 000.

f) El blanco consistió en la fila H. la cual tenía todos los ligandos exceptuando la fuente del receptor de INF γ . (el suero de paciente fue un suero normal a una dilución de 1/500).

g) Cada caja se hizo por duplicado, espaciándose los experimentos por un día.

La figura 7 nos muestra un experimento común de este sistema.

SUERO
3340

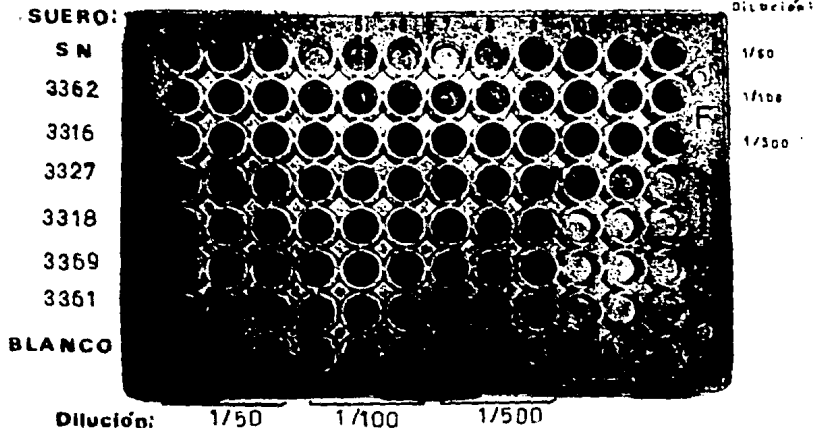


FIG 7.-Protocolo de búsqueda de un anticuerpo contra el receptor de INF γ .
De este modo se trata de ejemplificar una determinación típica de este anticuerpo por ELISA. Los sueros se ensayaron por triplicado a tres diluciones diferentes 1/50, 1/100 y 1/500. de este modo se obtuvo otra fila para usarla como ejemplificada por el suero 3340 en esta figura. SN es el suero normal. Como control negativo se usó una fila con suero normal y sin receptor de INF γ .

IV. 3. -TRATAMIENTO ESTADISTICO

IV. 3. 1. -MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL Y DE DISPERSION.

En cada uno de los inmunoensayos se obtuvieron las medias y desviaciones estandar de cada uno de los sueros de los pacientes y de los controles de cada enfermedad.

Los grupos de pacientes y controles tuvieron números equivalentes de sujetos

Del mismo modo se obtuvieron las medias y desviaciones estandar asociadas a cada grupo.

En cuanto a las diluciones trabajadas se dio lo siguiente:

a) En el caso del ensayo de "Detección de Ag ambiano circulante en el suero de pacientes con A.H.A.", se obtuvieron los parámetros para una sola dilución de suero y que fue 1/10.

b) Para el ensayo de "Busqueda de un Ac contra el receptor de INF y en el suero de pacientes con SLE", se obtuvieron 3 parámetros por suero asociados a cada una de las diluciones usadas:

1/50, 1/100 y 1/500.

IV. 3. 2. -INFERENCIA ESTADISTICA

Utilizando la estadística inferencial se intentó llegar a una decisión acerca de las poblaciones de cada grupo de pacientes, examinando solo una pequeña proporción de los mismos. Por medio de la prueba de hipótesis. (79)

IV. 3. 2. 1. -PRUEBA DE HIPOTESIS.

El procedimiento seguido puede resumirse en estos pasos:

1.-Datos: Se analizaron los parámetros obtenidos en los inmunoensayos (absorbancia y dilución) de los pacientes contra los datos de los controles.

2.-Suposiciones: Para ambos inmunoensayos se contó con la suposición de que los datos constituyen dos muestras aleatorias

independientes en cada inmunoensayo, cada una extraída de una poblaci3n distribuida de manera aproximadamente normal, con varianza poblacional desconocida, pero como un estimador contamos con las desviaciones estandar de las muestras.

Esto nos lleva a dos suposiciones aparte de las arriba mencionadas, sobre las varianzas poblacionales:

a) que las varianzas sean iguales. Para el caso del ensayo de Búsqueda de Ag amibiano circulante en pacientes con AHA.

Esto dado que los datos de cada grupo fueron obtenidos de dos muestras poblacionales semejantes, en cuanto a su estrato poblacional y lugar de procedencia (ambos del Hospital La RAZA y lugares aledaños al norte de la ciudad), se consider3 que las varianzas poblacionales aunque desconocidas pueden ser iguales.

b) que sean desiguales. Para el caso del ensayo de Detecci3n de un Ac contra el receptor de INF y en el suero de pacientes con LES

Esto dado que en este ensayo se supuso que los grupos control y de pacientes con LES provienen de poblaciones con varianzas desconocidas y desiguales, ya que los sueros fueron obtenidos en ańos diferentes (LES 1989 y control 1990) y del grupo de LES no se conocen muchos datos (como es el lugar de procedencia de los pacientes, tiempo de enfermedad, muchas de las caracteristicas clínicas, etc.).

4.- Estadística de prueba: Esta se calcula a partir de los datos de la muestra.

Dependiendo de la prueba se utilizaron las siguientes estadísticas de prueba:

a) Varianzas iguales. -

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{SP^2}{n_1} + \frac{SP^2}{n_2}}} \quad \text{-----Ec (1)}$$

Donde: \bar{x}_1 = valor promedio muestra 1
 \bar{x}_2 = " " " " " control

- n = número de mediciones efectuadas
 μ = media poblacional
 sp^2 = Estimación mencionada de la varianza común de las poblaciones.

$$Sp^2 = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad \text{-----} E_c (1.1)$$

donde : s^2 = varianza de la muestra
 s = desviación estándar

b) Varianzas desiguales:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \text{-----} E_c (2)$$

donde:
 Cada parámetro tiene el significado dado anteriormente.
 Solo t' indica una distribución aproximada con grados de libertad modificados.

5. -Distribución de la estadística de prueba. -

En ambos inmunoensayos la estadística sigue una distribución t o aproximadamente t .

Con los siguientes grados de libertad:

a) varianzas iguales $g^2 = n_1 + n_2 - 2$

b) varianzas desiguales. -Para este caso se usa un valor modificado de los grados de libertad; ya que no es correcto usar el valor precedente

$$d_{f'} = \frac{\left[\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_c^2}{n_c} \right]}{\left[\frac{S_1^2/n_1}{t} + \frac{S_c^2/n_c}{t} \right]} \dots\dots\dots E_c \quad (3)$$

donde t' esta distribuida aproximadamente como t .

IV.3.2.2. -INTERVALO DE CONFIANZA (ESTIMACION)

Por medio de este metodo se pudo observar la variabilidad de cada uno de los datos y llegar a conclusiones mas particulares. (2)

Se uso la distribucion t por las consideraciones ya expuestas y la fórmula a usar fue la siguiente:

Estimador \pm (coeficiente de confiabilidad) \times (error estandar)

$$\bar{x} \pm t (1 - \alpha/2) s/\sqrt{n}^{1/2}$$

V

RESULTADOS

ANALISIS DE RESULTADOS

- * Ac DE CONEJO ANTI AMIBA
- * Ac DE CARNERO ANTI IgG
HUMANA

V.- RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

V.1.-Ac DE CONEJO ANTI *E.histolytica*

V.1.1.-OBTENCION DEL EXTRACTO SOLUBLE DE *E.histolytica* PARA LA CONJUGACION CON SEFAROSA 4B.

De la metodología expuesta en el punto IV.1.1.2.1, se obtuvieron aproximadamente 10 ml de un extracto amibiano conteniendo una concentración equivalente a 4.9484 µg/ml de proteína por el método de BCA, correspondiente a 49.484 mg de proteína; la experiencia marca que puede obtenerse 800 µg de proteína/millon⁽⁴²⁾ de amibas, lo que implica que en 100 millones de ellas, se obtendría teóricamente 80 mg, esto nos proporciona un 61.85% de efectividad de la cosecha.

V.1.2.-DETERMINACION DEL GRADO DE EFECTIVIDAD DEL ACOPLAMIENTO DE PROTEINA A SEFAROSA 4B

Por medio del método de Fólín se determinó el grado de efectividad de este acoplamiento. Se utilizó el método de Fólín dado que la glicina presente en la mezcla proteica con el fin de enmascarar los grupos reactivos, causó una interferencia con el método de BCA.

Para esta determinación se utilizó como blanco la glicina 1.75 M en un tampon de carbonatos 0.1M pH 9.5

V.1.2.1.-ACOPLAMIENTO DEL EXTRACTO SOLUBLE DE AMIBA A SEFAROSA 4B

De la incubación de la sefarosa acoplada y la glicina se obtuvieron aproximadamente 19 ml de este sobrenadante con un total de 12.6240 mg de proteína; para el acoplamiento se usaron 24.742 mg de proteína del extracto soluble de amiba, lo que implica que obtuvimos un 48.17% de efectividad del acoplamiento.

V.1.3. -DETERMINACION DEL GRADO DE BIOTINILACION DEL ANTICUERPO DE CONEJO ANTI AMBA POR MEDIO DE DOT BLOT.

La figura 8 muestra los resultados obtenidos en esta determinación. Como se puede ver, el grado de biotinylation de este anticuerpo fue razonablemente bueno ya que la mancha del grado de biotinylation se puede observar entre un rango de proteina de 3-17 ng

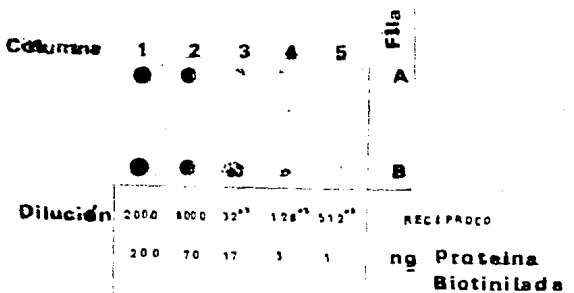


Fig 8. grado de biotinylation del Ac de conejo anti *E. histolytica*, marcado con biotina, determinación por Dot Blot; marcando la dilución del Ac y su equivalente en nanogramos de proteina.

V.1.4-TITULACION DEL AC DE CONEJO ANTI *E. histolytica* MARCADO CON BIOTINA.

La figura 9 muestra la curva de titulación del anticuerpo y compara esta con una curva obtenida solo con ASF. Esta es una de las formas de reportar esta titulación demostrando el grado de unión específica del anticuerpo a una capa sin el antígeno (curva con solo ASF). Como puede observarse el título fue a una concentración del anticuerpo de 0.3125 $\mu\text{g/ml}$.

Ac DE CONEJO B. vs *E. histolytica*
TITULO CONTRA Ag DE AMIBA

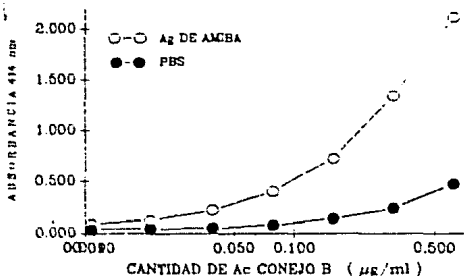


Fig 9. Titulo del Ac de conejo anti *E. hist.* marcado con biotina. En la figura también se muestra la unión inespecífica del anticuerpo con la caja a estas diluciones.

V.1.5. - DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DEL AC DE CONEJO ANTI *E. histolytica* MARCADO CON BIOTINA

En este punto se reporta la cantidad mínima de extracto soluble de *E. histolytica* determinado por este anticuerpo. Como muestra la figura 10 la cantidad de extracto de amiba donde la determinación todavía da una absorbancia mayor a 0.3 es a una dilución de 0.3125 µg/ml de proteína de amiba. En esta figura se ve también que el contaminante más común de este extracto amibiano, la albúmina sérica bovina⁽³⁰⁾, da una absorbancia de prácticamente 0 a esta concentración.

Del resultado de esta experiencia, se puede sacar extrapolaciones interesantes, ya que si consideramos que nuestro anticuerpo reconoce hasta 0.3125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antígeno amibiano y dado que el cuerpo humano tiene aproximadamente 5 % de sangre en promedio, podemos decir que nuestro anticuerpo detecta hasta 1.5625 mg de proteína amibiana en el cuerpo humano. En el laboratorio se ha visto que 1 millón de amibas produce aproximadamente 800 μg de proteína lo que implica que nuestro inmunoensayo puede detectar la proteína producida por la destrucción de 1.9531 millones de amibas en el cuerpo humano.

AC DE CONEJO B. vs *E. histolytica*
 CANTIDAD MÍNIMA RECONOCIDA DE Ag AMIBIANO

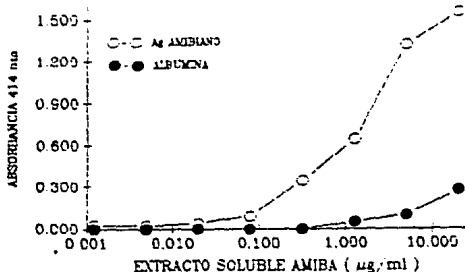


Fig 10.-El gráfico nos muestra la cantidad mínima de Ag amibiano que puede reconocer este anticuerpo y compara el grado de reacción inespecífica que da el contaminante albúmina

V.1.6.-RECONOCIMIENTO Y ELIMINACION DE INESPECIFICIDADES DEL ANTICUERPO DE CONEJO ANTI AMBA

V.1.6.1.- REACCIONES CRUZADAS

La principal fuente de inespecificidades encontrada en la producción de Ac's contra el antígeno de *E. histolytica* crecida axenicamente, es la presencia de Ac's dirigidos contra proteínas presentes en el medio en el cual se han cultivado estos parásitos ya que se encuentran actividades estas proteínas en la membrana celular amibiana, la principal proteína encontrada como contaminante es la albumina sérica bovina ^{30,39}.

En el punto V.1.4. se ve que a la dilución usada de este anticuerpo en los experimentos efectuados, la reacción cruzada con esta proteína (albumina) es prácticamente nula. Esto habla de una buena especificidad por parte del anticuerpo.

V.1.6.2.- DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE RECONOCIMIENTO DEL AC DE CONEJO CONTRA *E. histolytica* MARCADO CON BIOTINA

La figura 11 muestra la identificación de las especificidades inmunes de este anticuerpo. Su reactividad se definió mediante inmunoblot con el objeto de definir hacia cuantos diferentes antígenos se generaron anticuerpos. En esta figura también se muestran los diferentes pesos moleculares de las proteínas presentes en el patrón del extracto amibiano, los cuales fueron determinados mediante el gráfico 11.a el cual fue preparado en base a la franja de marcadores (tira 1) presente en la figura. Por este medio se pudo determinar que nuestro anticuerpo contra ameba está dirigido preferentemente contra 8 diferentes bandas proteicas de las 19 proteínas vistas en el patrón electroforético (tira 2) teñido con azul de Coomassie.

A)

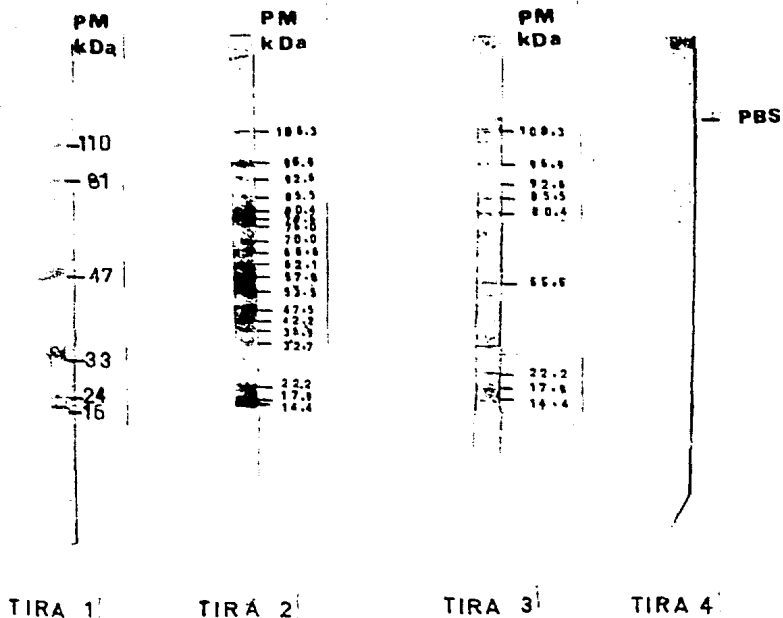


Fig II A).-La determinación de las especificidades inmunes se hicieron por inmunoblot. La tira 1 muestra una franja de marcadores de peso molecular: Fosforilasa conejo x pm 110; Albúmina bovina x pm 81; Ovalbúmina x pm 47; Anhidrasa carbónica x pm 33; Inhibidor de la tripsina de soya (soybean) x pm 24; Lisozima (huevo) x pm 16. Estos pesos moleculares son aparentes ya que estas proteínas corren diferente a las proteínas originales debido a el ataque covalente con el colorante. Tira 2.-patrón electroforético del Ag ambiente teñido con azul de Coomassie. Tira 3.-patrón de reconocimiento del Ac contra Ag de amiba revelado con DAS. Tira 4.-blanco de la tira 3, con PBS. (para ver reacciones inespecíficas)

B)

CURVA PATRON Marcadores de Peso Molecular

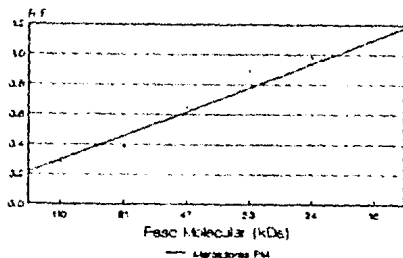


FIG. 11.-B) Curva utilizada para la determinar el peso mol. de las 10 bandas proteicas obtenidas del patrón electroforético del Ag de *E. histolytica*. Esta curva esta basada en los marcadores de peso molecular y en el R_f de su corrimiento en la electroforesis.

V.1.7.-DETECCION DE ANTIGENO AMEBIANO CIRCULANTE EN EL SUERO DE PACIENTES CON ABSCESO HEPATICO AMEBIANO

V.1.7.1.-DATOS

En la figura 12 se presentan los resultados obtenidos en el ensayo en el suero de 14 pacientes con A.H.A y como control negativo el promedio de la prueba en 16 sueros de personas clinicamente normales.

En esta figura se anexan el titulo de anticuerpos contra *E. histolytica* de cada paciente, observandose a simple vista una posible relacion inversa entre la cantidad de Ag amebiano circulante y el titulo de anticuerpos del mismo suero diluido 1:100. Esto es logico de pensar ya que los anticuerpos pueden

llevar a cabo un "clareado" del antígeno circulante sacándolo de circulación. Por el número de datos que contamos esto no se ha podido comprobar.

V.1.7.2.-ESTADISTICA

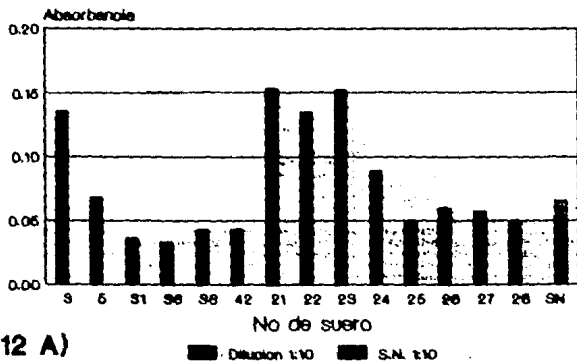
V.1.7.2.1.-Medidas de tendencia central y de dispersión.

La media y desviación estándar obtenida de cada grupo se reportan a continuación en la tabla 9

Fig. 12.-Prueba por ELISA en busca de Antígeno de amiba en el suero de pacientes con A.H.A (A); y la determinación del título de anticuerpos contra *E.histolytica* (B). Los números dados corresponden al número control de los pacientes. El suero No. 42 no fue determinado en cuanto a su cantidad de Ac contra *E.histolytica*. **SN** implica el promedio de la determinación de 16 sueros normales.

Ag AMIBIANO CIRCULANTE

Pacientes con absceso hepatico amibiano



Ac CIRCULANTE vs E. histolytica

Pacientes con absceso hepatico amibiano

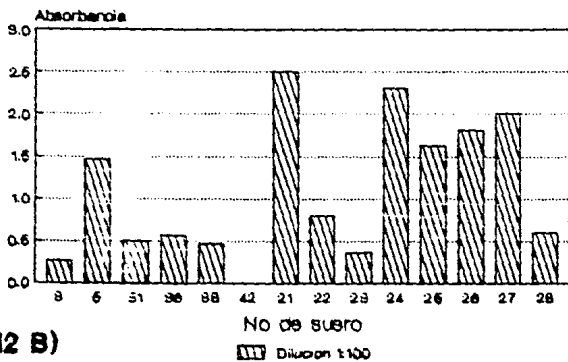


TABLA 9

MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL Y DISPERSION EN EL ENSAYO DE BUSQUEDA DE Ag AMBIANO CIRCULANTE

	A H A	CONTROL
MEDIA ARITMETICA	$\bar{x}_A = 0.0789$	$\bar{x}_C = 0.0452$
DESVIACION ESTANDAR	$s_A = 0.0655$	$s_C = 0.0335$
n	14	16

V.1.7.2.2. -Inferencia Estadística.

Datos.-Los datos fueron las absorbancias obtenidas del ensayo de un grupo de 14 pacientes con A.H.A y un grupo control (16 individuos), a una sola dilución de 1/10, los cuales están contenidos en la tabla 9, y se contrastaron usando las siguientes hipótesis

Hipótesis.- $\chi_0: \mu_A - \mu_C = 0$
 $\chi_A: \mu_A - \mu_C \neq 0$

y con la suposición de que las varianzas poblacionales son iguales¹

Distribución de la Estadística de prueba.-Cuando la hipótesis nula es verdadera, la estadística de prueba sigue la distribución t de Student con $n_A + n_C - 2$ grados de libertad. $gl = 28$

Regla de Decisión.-Considerando un $\alpha = 0.1$, los valores

¹ Si se considerara la otra opción que las varianzas sean desiguales los resultados no varían significativamente.

críticos de t fueron ± 1.7011 . Se aceptó H_0 , ya que la estadística de prueba entro en el siguiente intervalo

$$-1.7011 < t_{\text{calculada}} < 1.7011$$

Como Decisión Clínica. -Se encontró que en base a los datos, no se puede concluir que las dos medias de la población sean diferentes.

V.2. A. DE CARNERO ANTI IgG HUMANA

V.2.1. -OBTENCIÓN DE IgG DE RATÓN PARA LA CONJUGACIÓN CON SEFAROSA 4B.

De la diálisis de un lote de inmunoglobulinas de ratón se obtuvieron 333.618 mg de proteína por el método de Folín. La subsecuente purificación por cromatografía de intercambio iónico reportó 8 ml de IgG de ratón con una cantidad de proteína equivalente a 279.31 mg. Esto nos deja unos 54.3012 mg de inmunoglobulinas y otras proteínas que son no son IgG. El corrimiento electroforético de esta proteína (dato no mostrado), el cual muestra una amplia gama de bandas hace pensar en un posible error en la purificación (ver punto V.2.6.2 de esta misma sección).

V.2.2. -DETERMINACIÓN DEL GRADO DE EFECTIVIDAD DEL ACOPLAMIENTO DE IgG DE RATÓN A SEFAROSA 4B

De la incubación se obtuvieron 19.7 ml del sobrenadante con una cantidad total de proteína de 16.1842 mg. Dado que para el acoplamiento se utilizaron 34.9146 mg de IgG de ratón, entonces obtuvimos un 53.64% de efectividad del acoplamiento.

V.2.3. -DETERMINACIÓN DEL GRADO DE BIOTINILACIÓN DEL ANTICUERPO DE CARNERO CONTRA IgG HUMANA BIOTINILADO POR MEDIO DE DOT BLOT.

La figura 13 muestra los resultados de este experimento demostrando un buen grado de biotinilación, dado que la mancha descrita todavía es observable a unos 2 ng de proteína biotinilada.

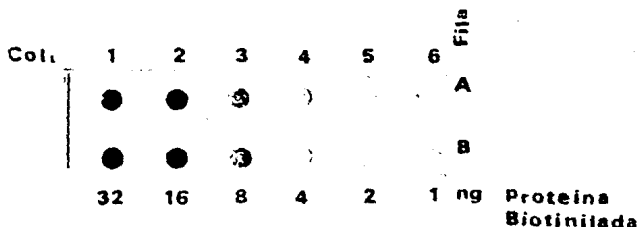


Fig 13.-Grasa de biotinitación del Ac de conejo contra IgG humana marcada con biotina. Determinación por Dot blot: El Ac se diluyó para obtener la cantidad de Ac equivalente a los ng de proteína indicados.

V.2.4. -TITULACION DE LOS ANTICUERPOS

V.2.4.1. -TITULACION DEL AC DE CONEJO ANTI IgG HUMANA MARCADO CON PEROXIDASA.

En la figura 14 se muestran los resultados de esta titulación. En esta gráfica y en la del mismo anticuerpo pero marcado con biotina, se muestra otro modo de reportar estos resultados y que es el de incluir la unión inespecífica a los datos de la titulación mostrando una sola curva descendente. Se restan estos datos a los dados sobre el antígeno.

El título de este anticuerpo fue a una dilución de éste de 1:2 000.

AC CARNERO Po ANTI IgG HUMANA
TITULO CONTRA IgG HUMANA

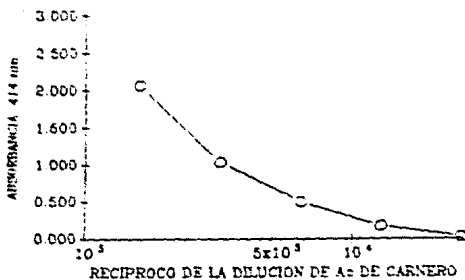


Fig 14 La dilución a la cual debería de usarse este anticuerpo fue determinada en base a este experimento, para obtener datos que en los experimentos posteriores sigan la ley de Beer.

V.2.4.1.-TITULACIÓN DEL AC DE CARNERO ANTI IgG HUMANA MARCADO CON BIOTINA

La figura 15 nos muestra esta titulación, donde se puede observar que la dilución donde la absorbancia es mayor o igual a 1.0 es a una dilución del Ac de 1/20 000.

Ac CARNERO BIOT. ANTI IgG HUMANA
TITULO CONTRA IgG HUMANA

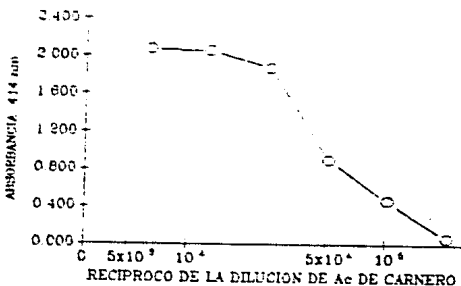


Fig 15. Por medio de este gráfico se determinó que este anticuerpo biotinizado debería de utilizarse a una dilución de 1/20 000 del anticuerpo ante una cantidad de 5 mg/ml de IgG humana da una absorbancia de aproximadamente 1.0.

V. 2. 5. -SENSIBILIDAD DE LOS ANTICUERPOS ACOPLADOS A UN MARCADOR.

V. 2. 5. 1. -DETERMINACION DE LA CANTIDAD MINIMA DE IgG HUMANA RECONOCIDA POR EL Ac DE CARNERO ANTI IgG HUMANA MARCADO CON BIOTINA

Tal como lo marca la figura 15. en estas condiciones el anticuerpo detecta hasta una dilucion de 0.625 mg/ml de IgG humana lo que implica 31.25 ng de esta proteina en cada pozo (ya que pusimos 50 μ l de esta dilución).

AC CARNERO BIOT. vs IgG HUMANA
CANTIDAD MINIMA RECONOCIDA DE Ag

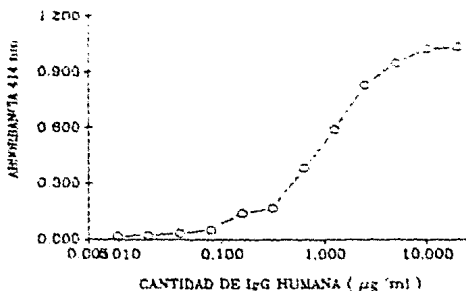


Fig. N° 4 por medio de este gráfico podemos encontrar la sensibilidad de nuestro anticuerpo a las condiciones dadas en el experimento. Esta cantidad tal vez pueda extrapolarse para conocer la cantidad de Ac contra receptores de INF y en el suero de los pacientes.

V.2.5.2.-DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DEL AC. DE CARNERO ANTI IgG HUMANA MARCADO CON PEROXIDASA

Como se puede ver en los puntos IV.2.1.5.1 y IV.2.1.5.2 de material y métodos la determinación de la sensibilidad de estos dos anticuerpos difiere en la metodología de esta determinación. En orden cronológico el tipo de determinación del punto IV.2.1.5.2. fue primero al del punto IV.2.1.5.1. Estos dos anticuerpos fueron ensayados para conocer su sensibilidad según el punto IV.2.1.5.2. encontrándose que el anticuerpo biotinizado tenía una sensibilidad 4 veces mayor que el marcado con peroxidasa.

Este dato aunado al del resultado del punto V.2.5.1.1 en el cual

no se vio diferencia entre diluciones del suero normal humano nos llevó a descartar este anticuerpo para posteriores determinaciones.

La metodología descrita en el punto IV.2.1.5.1 se descubrió después trabajando en las inespecificidades del Ac de carnero biotinilado. Por tanto, para seguir correctamente con la metodología se tuvo que determinar otra vez la sensibilidad de este anticuerpo siguiendo las condiciones reportadas en el punto IV.2.1.5.1 (esto ya no se hizo sobre el anticuerpo peroxidado ya que éste se había descartado antes).

V.2.6.-RECONOCIMIENTO Y ELIMINACION DE INESPECIFICIDADES DE LOS ANTICUERPOS

V.2.6.1.-DETERMINACION DE LA DILUCION DEL SUERO DE PACIENTE A USAR EN LOS INMUNOENSAYOS CON EL AC DE CARNERO ANTI IgG HUMANA.

V.2.6.1.1.-Ac de carnero anti IgG humano marcado con peroxidasa

Como una prueba más de la calidad de estos anticuerpos se trató de determinar la dilución de suero normal humano a la cual la absorbancia debida a una unión inespecifica (en la placa previamente saturada) sea menor de 0.2^2

En el caso de este anticuerpo peroxidado los valores obtenidos varían dentro de un rango que va de 0 a 0.029, pero estas absorbancias no siguen un orden en cuanto a las diluciones ensayadas, ni por la variación de suero. Esto, aunado a la sensibilidad mostrada por el anticuerpo, nos llevó a desecharlo para experimentos posteriores.

² Lo cual es una absorbancia de fondo razonable, ya que absorbancias menores no se pueden diferenciar de las dadas solamente por la variabilidad del método.

para experimentos posteriores.

V.2.6.1.2. -Anticuerpo de carnero anti IgG humana marcado con biotina.

En este caso si se vieron diferencias entre diluciones en los 9 sueros ensayados. La tabla 10 marca los resultados promedio de este ensayo.

TABLA 10

ACTIVIDAD INESPECIFICA DE LOS SUEROS HUMANOS NORMALES RECONOCIDOS POR EL Ac CARNERO ANTI IgG HUMANA B.	
DILUCION	ABSORBANCIA PROMEDIO
Concentrado	0.5788
1/25	0.2878
1/125	0.1822
1/500	0.1417
Fondo	0.0744

Estos son los resultados promedio de 9 sueros humanos probados. El fondo equivale a la inespecificidad que da el anticuerpo biotinilado a una dilucion de 1/20 000 cuando no existe suero humano alguno en los pozos.

En realidad no se ve gran diferencia entre las diluciones 1/125 y 1/500, por lo cual se considero que era indiferente el usar cualquiera de estas diluciones en los experimentos subsecuentes.

V.2.6.2. -REACCIONES INESPECIFICAS DEL Ac DE CARNERO BIOTINILADO CONTRA IgG DE RATON.

La figura 17 nos desarrolla esquematicamente las variables involucradas en este experimento asi como los resultados obtenidos

VARIABLES	SA	S.A	SA	SA	
	JL ^{-B}	JL ^{-B}	JL ^{-B}	JL ^{-B}	SH
		⊙			⊙
	L ₁ ^J	L ₁ ^J	L ₁ ^J	L ₁ ^J	
	L----J	L----J	L----J	L----J	
COLUMNAS	1,2,3	4,5,6	7,8,9	10,11,12	
RESULTADOS					
FILAS	VARIABLES				
A	1.31	1.926	1.737	2.2	Ac biotinilado (no preinc con SN ratón.
±	0.050	0.058	0.068	0.122	
B	0.085	0.295	0.249	0.467	carece de Ac de captura
±	0.018	0.050	0.012	0.050	
C	0.036	0.425	0.263	0.567	Ac biotinilado preinc. con 1/10 SN ratón
±	0.009	0.017	0.021	0.012	
D	0.007	0.046	0.065	0.116	carece de Ac de cap- tura
±	0.003	0.003	0.007	0.011	

claves: SA=estreptavidina-po JL^B = Ac biotinilado
 SH =suero normal humano ⊙ = receptor INF γ
 L₁^J =Ac de captura L----J = pozo

Fig. 17. Muestra las columnas de la placa de ELISA en forma esquemática. Por otro lado marca las filas de la placa con las condiciones dadas en el punto IV. 2. 2. 1. 2. 1

V. 2. 7. -BUSQUEDA DE UN ANTICUERPO CONTRA EL RECEPTOR DE INF , EN EL
 SUERO DE PACIENTES CON LES EPIDEMIOLOGICO SISTEMICO

V. 2. 7. 1. -DATOS

la figura 18 presenta los datos obtenidos del ensayo de 40 sueros de pacientes con LES en este sistema. asi mismo cada grafica se acompaña del promedio de la determinación del suero de 41 personas sanas. El suero 3316 fue una clara desviación de los patrones, por lo tanto fue sacado de las medias en base a no influenciar con su magnitud los resultados obtenidos. Este suero será tratado aparte.

V. 2. 7. 2. -ESTADISTICA

V. 2. 7. 2. 1. -Medidas de Tendencia central y de Dispersión

Las medidas de estos dos grupos en cuenta a las diferentes diluciones ensayadas se reportan en la tabla 11.

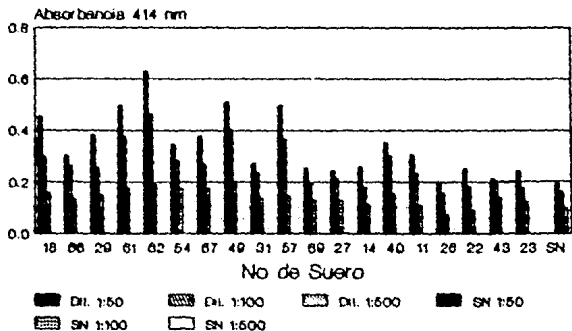
TABLA 11

MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL Y DISPERSION EN EL ENSAYO DE BUSQUEDA
 DE UN ANTICUERPO CONTRA INF γ

DILUCION	MEDIDA ARITMETICA	DESVIACION ST	n
LES	\bar{x}_l	s_l	39
1-50	0.3256	0.1110	
1-100	0.2553	0.1152	
1-500	0.1418	0.0332	
CONTROL	\bar{x}_c	s_c	41
1-50	0.1935	0.0814	
1-100	0.1622	0.0609	
1-500	0.0998	0.0301	

Fig 18. Prueba por ELISA en busca de un anticuerpo contra el rINF
γ en el suero de pacientes con LEE. En cada gráfico en cada suero
están marcados los resultados de esta determinación a 3 diluciones
diferentes. A los números de suero se les debe de anteponer el
prefijo 33 el cual no se marca por cuestiones de espacio. En cada
gráfico se anexa los resultados de el promedio de 41 sueros
normales, denotados como SN.

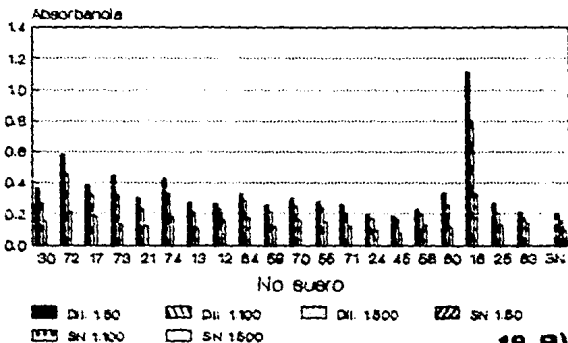
Ac vs Receptor de INF gamma Pacientes con LES



LES 1 A cada numero de suero corresponde
el postulo BS

18 A)

Ac vs RECEPTOR INF gamma Suero de pacientes con LES



LES 2

18 B)

V.2.7.2.2. -Inferencia Estadística

V.2.7.2.2.1. -Prueba de Hipótesis

Datos.-Los datos son las absorbancias obtenidas del ensayo por ELISA de un grupo de pacientes con LES y un grupo control en un ensayo de búsqueda de un Ac contra rINF y; estos datos están contenidos en la tabla 11

Estos datos se contrastaron usando las siguientes hipótesis:

$$\text{Hipótesis. - } \chi^2_0 = m_1 - m_c = 0$$

$$\chi^2_A = m_1 - m_c \neq 0$$

Y con la suposición de que las varianzas son desiguales³.

Distribución de la Estadística de prueba.-Cuando la hipótesis nula es verdadera, la estadística de prueba se distribuye aproximadamente como la distribución t de Student, con los grados de libertad dado en el inciso 5) del punto IV.3.2.1 de material y métodos.

Regla de Decisión.-En este inmunoensayo se trabajo con 3 valores de α los cuales son: 0.1, 0.05 y 0.01; usando unos grados de libertad modificados los cuales dependen de la dilución usada.

$$1/50 \quad dt' = 71.3469$$

$$1/100 \quad dt' = 58.4985$$

$$1/500 \quad dt' = 78.2978$$

de modo que los valores críticos de t varían con los valores de α y de la dilución usada como se expresa en la tabla 12.

³ Considerar que las varianzas son iguales no cambia sustancialmente los resultados.

TABLA 12

		REGLA DE DECISION		
DILUCION		1/50	1/100	1/500
NIVEL DE SIGNIFICANCIA				
$\alpha = 0.1$	valores criticos	± 1.6569	± 1.6707	± 1.6841
$\alpha = 0.05$	valores criticos	± 1.9945	± 2.0003	± 1.9901
$\alpha = 0.01$	valores criticos	± 2.6480	± 2.6503	± 2.6386

Rechazandose H_0 en cada caso a menos que la $t_{calculada}$ en cada caso, entre en el intervalo correspondiente.

Estadística de Prueba Calculada.-Utilizandose la formula indicada en el inciso 4 se construyo la siguiente tabla 13 la cual contiene los valores de la estadística en cada dilucion.

TABLA 13

ESTADISTICA DE PRUEBA CALCULADA LES	
DILUCION	$T_{CALCULADA}$
1/50	5.0451
1/100	4.4674
1/500	5.9466

Decisión Clínica.-Como puede observarse por estos resultados, los datos presentados nos llevan a la conclusión de que las medias poblacionales sí son diferentes significativamente entre sí hasta con una $P \geq 0.01$

V. 2. 7. 2. 2. 2. -Intervalos de Confianza

Por medio de este método se trató de hacer más evidente la conclusión a la que hemos llegado arriba, del mismo modo se trató de observar particularidades inherentes a esta determinación. Por cada dilución se hicieron 3 intervalos de confianza, uno por cada valor de α utilizado. Los valores de α fueron 0.01, 0.05 y 0.1

La tabla 14 muestra los intervalos de confianza por dilución utilizada; para su desarrollo se contó con los datos de la tabla 11

TABLA N

ESTIMACION DE μ CONTRA RECEPTOR DE INF γ			
DILUCION	1/50	1/100	1/500
<p>NIVEL DE SIGNIFICANCIA</p> <p>$\alpha = 0.1$</p> <p>$t = 2.7045$</p>	0.1591,0.227	0.1365,0.1878	0.0864,0.1123
<p>$\alpha = 0.05$</p> <p>$t = 2.0211$</p>	0.1678,0.2192	0.1430,1.1814	0.0901,0.1091
<p>$\alpha = 0.01$</p> <p>$t = 1.6839$</p>	0.1721,0.2149	0.1462,0.1762	0.09168,0.1075

En un esfuerzo de hacer más evidente las particularidades inherentes al uso de los intervalos de confianza se utilizo un artificio usado en producción de procesos industriales,el cual tiene como fin el poder observar cuando este se sale de control y rebasa los estandares permitidos.Esto es una carta control en donde se grafican 3 líneas,los cuales son llamados limites,estos son el Limite Central,el Inferior y el Superior;estos siguen los lineamientos vistos en los intervalos de confianza.

Los graficos 10 muestran un ejemplo de esto utilizando un 99% de confianza (es decir, límites de ± 3 errores estandar,de ancho),el cual es el más ancho y tiene mayor probabilidad de incluir los datos particulares de los sueros problema.En estos graficos aunque presentan los limites mas anchos como intervalo,se nota que casi todos los datos de los sueros vaciados en el grafico salen de este intervalo.

La aplicación de estos sistemas de intervalos de confianza a nuestros sueros problema nos llevan a interesantes observaciones

1) La gran mayoría son diferentes a la media de los controles con un 99% de confianza ($P \leq 0.01$), en todas las diluciones, con las siguientes excepciones: El suero 3363 solo es diferente a la media de los controles en una dilución 1/50, pero con una $P=0.1$, y a una dilución de 1/500 con una $P=0.01$, esto no pasa en la dilución 1/100.

2) Los sueros 3314, 3322 y 3323 son diferentes a la media de los controles con una $P=0.01$ a una dilución de 1/50 pero si los diluimos a 1/100 son diferentes solo con una $P=0.1$. El suero 3322 no es diferente a partir de la dilución 1/100. Los sueros 3314 y 3323 vuelven a ser diferentes a la media de los controles en una dilución 1/500, con una $P=0.01$

3) El suero 3311 es diferente a la media control con una $P=0.01$ diluido 1/50 y 1/100, lo cual no pasa a una dilución de 1/500 donde solo es diferente con una $P=0.05$

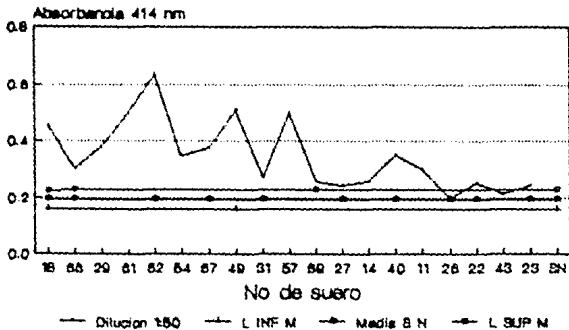
4) Los siguientes sueros no son diferentes a la media control en ninguna dilución: 3356, 3324, 3326.

Figura 19. - Muestra de una forma gráfica un intervalo de confianza con un 99% de confianza (el cual es el más ancho y cabría esperar que en él entrasen la mayor cantidad de sueros), por medio de un gráfico de control de Shewhart. En esta figura solo se muestran los sueros a una dilución de 1/50

A los números de sueros hay que anteponerles el prefijo 33 (el cual no se presenta por funciones de espacio); L INF M. - es el Límite inferior Medio el cual es la media aritmética del grupo control menos 3 errores estándar; L SUP M. - Es el límite superior medio y MEDIA SN. - la media de la determinación de 41 sueros normales.

Cartas como estas, con las diferentes diluciones y niveles de α correspondientes, nos llevaron a los resultados expuestos en el punto V.2.7.2.2.2.

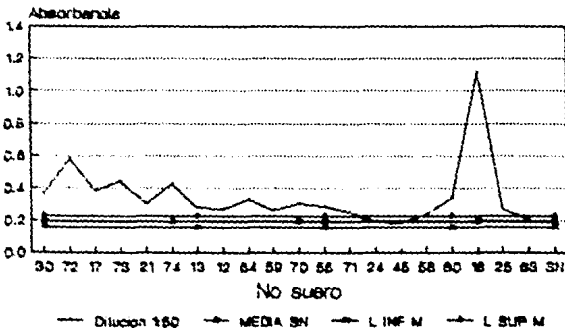
Ac vs RECEPTOR INF gamma PACIENTES CON LES



LES 1 CARTA CONTROL P<0.01
99% DE CONFIANZA

19 A)

Ac vs RECEPTOR INF gamma Suero de pacientes con LES



LES 2 CARTA CONTROL P<0.01
99% DE CONFIANZA

19 B)

IV

DISCUSION

- SISTEMA DE DETECCION DE Ag DE AMIBA CIRCULANTE EN EL SUERO DE PACIENTES CON AHA
- SISTEMA DE BUSQUEDA DE UN Ac CONTRA EL RECEPTOR DE INF GAMMA EN EL SUERO DE PACIENTES CON LES

PERSPECTIVAS

VI.-DISCUSION

Durante los últimos 20 años se han utilizado anticuerpos unidos a marcadores, como una herramienta para la investigación de muchos aspectos de la Bioquímica y Medicina, incluyendo estudios de la estructura de los anticuerpos, cinética de reacciones inmunes, síntesis de proteínas y terapia del cancer. ⁽¹²⁾

Desde 1968 año en que su uso se extendió a la medición de antígenos solubles por las técnicas llamadas de ensayo inmunoradiométrico y actualmente por medio de los ensayos inmunoenzimáticos, la Inmunología ha sufrido un gran auge. ^(28,12)

Debido a esto en el presente trabajo se buscó llegar a la obtención de dos anticuerpos los cuales fueran específicos y de título elevado, para que en base a estos lográramos obtener 2 inmunoreactivos que pudieran ser usados en tópicos interesantes de la Inmunología, como son la Inmunoparasitología y la posible elucidación de etiologías en la Medicina Humana.

Para tal efecto se procedió a dar un tratamiento a 2 anticuerpos para poder llegar a la obtención de dos reactivos biológicos los cuales detectaron específicamente antígeno de *E. histolytica* e IgG humana respectivamente.

Estos anticuerpos sufrieron procesos de marcaje, purificaciones por inmunofinidad y pruebas rigurosas de sensibilidad y especificidad. De estos procesos obtuvimos los siguientes anticuerpos : *1^o Ac de conejo anti E. histolytica cerna XMI* y *Ac de carnero contra IgG humana* marcados ambos con biotina.

Durante el proceso de selección mencionado arriba, se descartó un tercer anticuerpo que fue un *Ac de carnero contra IgG de humano* marcado con peroxidasa en base a su título no tan alto, a su pobre sensibilidad y especificidad tal como lo marcan los puntos V.2.4.1, V.2.5.2 y V.2.6.1.1. de RESULTADOS.

Los 2 anticuerpos obtenidos de este modo pueden ser considerados como inmunoreactivos en base a que cumplen los requisitos dados por Miles y Hales en 1966.¹

Primero.-En un ensayo de prueba, la respuesta de medición fue detectable a muy baja concentración del producto.

Segundo.-Todos los compuestos no conocidos reaccionaron en menor proporción en el ensayo.

y Tercero.-El procedimiento indicado para la prueba de cada anticuerpo dio un fondo muy bajo y los cambios en la respuesta observada fueron en directa proporción a los cambios en la concentración del producto.

Las características cuantitativas de estos anticuerpos se resumen en la tabla 15

TABLA 15

INMUNOREACTIVOS: CARACTERISTICAS

Ac	MARCADOR	TITULO	SENSIBILIDAD µg/ml	FONDO Absorb.
Conejo anti E. hist.	Biotina	0.3125 µg/ml	0.3125 Ag ambiente	0
Carnero anti IgG humana	Biotina	1/20 000	0.625 IgG humana	0.08

Como es de notarse el marcaje con biotina resultó mas acorde a nuestras necesidades, esto basado en la amplificación tan grande de la respuesta y a la especificidad que da el sistema de ¹ mencionado en ref 12

marcaje, ya que tiene el sistema estreptavidina-biotina una $K_{dissociacion}$ de $10^{-15} M^{-1}$ (73).

En base a estos resultados se utilizaron estos anticuerpos en dos inmunoensayos ideados para probar su actividad. A continuación discutimos aspectos importantes de estos inmunoensayos, y por ende aspectos inherentes a nuestros anticuerpos.

SISTEMA DE DETECCION DE A₉ DE AMBA CIRCULANTE EN EL SUERO DE PACIENTES CON AHA

En el presente trabajo se trató de desarrollar un método específico y manejable para el diagnóstico de infecciones amebianas presentes, basado en la detección de componentes amebianos en la circulación de pacientes con AHA.

Esta idea estuvo basada en la consideración de que el hígado, siendo un órgano muy irrigado, al destruir algunas amebas, probablemente libere antígenos amebianos a la circulación, los cuales podrían detectarse en el suero mediante la técnica de ensayo inmunoenzimático.

Para este efecto se produjo un anticuerpo que solo reconoce antígeno de *E. histolytica*, el cual pasó por rigurosas pruebas de especificidad (gráfica 9) y dio una sensibilidad que en ese momento consideramos adecuada, al lograr detectar el antígeno circulante, equivalente a la destrucción de aproximadamente 2 millones de amebas en el cuerpo humano, (ver punto IV.1.1.5).

Por los resultados expuestos en la sección correspondiente podemos observar que todavía no hemos llegado a la sensibilidad y especificidad necesaria para el desarrollo de este sistema, ya que nuestro sistema no discrimina, con un nivel de significancia apreciable, los sueros de pacientes con AHA y los sueros de personas clínicamente sanas (hasta el momento no hemos logrado discernir si la falla del sistema radica en una pobre especificidad o sensibilidad del sistema, ya que como hemos

reportado el sistema, paso favorablemente las pruebas de especificidad a las que lo sometimos y para decir que el fallo radica en la sensibilidad del anticuerpo, sería menester probar los sueros en un sistema lo mas parecido al nuestro.

La búsqueda de un sistema que detecte el Ag ambiano circulante en pacientes con amibiasis invasora se remonta desde 1978 hasta nuestros días, siguiendo metodos de las mas variadas características.

La tabla 16 nos muestra algunos de los datos obtenidos en estos sistemas usando técnicas de radioinmunoensayo y de ensayos inmunoenzimáticos, al mismo tiempo ubica nuestro ensayo entre estos.

TABLA 16

DETECCION DE Ag AMIBIANO CIRCULANTE:
COMPARACION DE SISTEMAS

AUTORES	Ac DE CAPTURA	POSICIONAMIENTO	Ac DETECTOR	NIVEL DE DETECCION	PRUEBA
HERNANDEZ 82 ⁽²⁷⁾	CONEJO ANTI AMIBA	NO	CONEJO ANTI AMIBA-FOS FATASA	1 ng	-----
REBANO ⁽²⁸⁾ 82	CONEJO ANTI AMIBA	NO	CONEJO ANTI AMIBA-PO	4 ng	abceso en hampi dorado
PILLAI ⁽²⁹⁾ 82	HUMANO ANTI AMIBA	SI	CONEJO ANTI AMIBA-1 ¹²⁵	40 ng	-----
VINAYAK ⁽³⁰⁾ 80	190 DE CONEJO ANTI AMIBA	NO solo por DAE	CONEJO ANTI HUMANO-PO	POSITIVO titulos mayores a 1:100	-----
DANDHI ⁽³¹⁾ 88	HUMANO ANTI AMIBA	SI	HUMANO ANTI AMIBA-PO	POSITIVO titulos mayores a 2 Desv. St. del control	-----
MOHIMEN ⁽³²⁾ 80	CONEJO ANTI HUMANO	SI	CONEJO ANTI E. hist. ¹²⁵	aprox 10 µg	complej inmunes artific les Ac mano-Ag amiba
EL NUESTRO 80	CONEJO ANTI E. hist.	SI	CONEJO ANTI E. hist. - ¹²⁵ CT	15 ng	-----

CONTINUACION.

	INESPECIFICIDAD	TÉCNICA
HERNANDEZ 82	NO SE PROBO EN PACIENTES	ELISA
RESANO 82	DIO ALGUNOS FALSOS POSITIVOS Y EN OTROS CASOS DIO FALSOS POSITIVOS	ELISA
PILLAI 82	COMPLEJOS PRECIPITADOS POR POE. SIN PRECIPITAR NO LOS DETECTA	RADIOINMUNOENSAYO
VINAYAK 80	COMPLEJOS PRECIPITADOS POR POE.	ELISA
GANDHI 80	CUALITATIVO	ELISA
MONIMEN 80	NO DETECTA ANTIGENO AMIBIANO LIBRE. DETECTA PACIENTES SIN ANTECEDENTES	RADIOINMUNOENSAYO
EL NUESTRO 80	NO DISTINGUE PACIENTES DE CONTROLES	ELISA

Como puede observarse en esta tabla, ya existen una gran cantidad de sistemas para esta detección, por lo cual el objetivo de la producción de nuestro sistema no era el de llegar a descubrir antígeno amibiano circulante en el suero de estos pacientes, sino, de llegar a un sistema que cumpliera los requisitos para poder ser llevado a una escala mayor en el diagnóstico, en

cuanto a que el conjugado fuera económico, de un nivel alto de reactividad, estabilidad para su uso en áreas difíciles de guardar o conservar y el uso de sustratos menos carcinogénicos como es el caso del ABTS. ⁽²⁸⁾

En cuanto al sistema, se trató de obtener uno con un tiempo de desarrollo del ensayo menor a 1 día, ya que los sistemas anteriormente expuestos tienen tiempos de desarrollo de entre 1 a 7 días ; esto es ya que, exceptuando 3 sistemas (incluido el nuestro), estos sistemas necesitan la precipitación de los antígenos ambientales en forma de complejos inmunes (lo que implica incubaciones mayores de 6 hrs). ^(30,47,70)

Por esto no se usó esta precipitación en nuestro sistema además de que se ha encontrado que la precipitación de los complejos inmunes implica un agrupamiento del antígeno, pero a la vez al "secuestrar" moléculas de agua, ⁽³⁰⁾ desnaturaliza en cierta manera al antígeno descubriendo epitopes para los cuales tal vez no tengamos anticuerpos. Además de que esta precipitación puede traer consigo conglomerados de otras partículas que nos puedan dar reacciones inespecíficas ², por lo cual esta operación no se efectuó en nuestro sistema.

Algunos autores dan ciertos argumentos los cuales pueden ser aplicados a la falla de nuestro sistema:

En la India, en 1982 ⁽³¹⁾, algunos autores proponen que muchos de los antígenos ambientales circulantes en el suero de los pacientes pueden ser inmunogénicos en humanos, pero no serlo para conejos, al fallar un sistema desarrollado por ellos con anticuerpos de conejo. Es necesario hacer notar que esto se contradice con varios de los sistemas reportados en la tabla 10.

Los mismos autores en 1984 ³ reportan la naturaleza de la proteína ambiental presente en los inmunocomplejos localizados en los

² Dr. Calderón (datos no publicados)

³ mencionado en ref 32

pacientes con AHA, como una proteína de membrana con un peso molecular de 35 000 Da y la cual no es extraíble por detergentes; como se recordará nuestro antígeno usado para la inmunopurificación de nuestro anticuerpo, es una proteína extraíble por Triton X-100 al 0.5% ⁴

Por otra parte, el que México sea una zona endémica en cuanto a amibiasis, nos permite una razonable duda en cuanto a que nuestros controles fuesen "clínicamente sanos", ya que no queda descartada una amibiasis asintomática en humanos en muchos de ellos.

Nosotros sabíamos de antemano que el presente sistema presentaba muchos riesgos, ya que es posible que los productos de secreción o de desintegración de los trofozoitos en el tejido hepático, fuesen capturados eficientemente por los polimorfonucleares y los fagocitos mononucleares que circundan a la zona de lesión de la amiba, lo que redundaría en una baja cantidad de antígeno, además de posibles efectos de prozona en presencia de altas cantidades de anticuerpos circulantes anti amiba, pero en base a los datos reportados se corrió el riesgo al buscar este antígeno.

Otro de los objetivos de la búsqueda de este sistema era el de obtener una herramienta de gran valor en el estudio de la Biología Molecular e Inmunoquímica de *E. histolytica*; esto para un posible descubrimiento de la identidad de los antígenos circulantes con relevancia inmunoprotectora contra la enfermedad ya que sobre este punto se sabe que hay inmunogenicidad efectiva en las fracciones lisosomal y ribosomal, así mismo se han localizado componentes antigenicos sobre la superficie del parásito; esto tal vez viene dado por un intercambio entre las membranas plasmática y citoplasmática recicladas. (32)

En este laboratorio se han hecho otros estudios encaminados a esto: En un estudio de 30 sueros, estos reconocían diferente patrón

⁴ Estos datos fueron encontrados cuando ya se había terminado la fase experimental.

antigenico de la membrana plasmática de la *E.histolytica* detectado por inmunoblot. sin embargo 2 bandas prominentes, la de 166 kDa y la de 200 kDa, fueron reveladas como un común denominador por la mayoría de los sueros de estos pacientes. ⁽⁴²⁾

El presente sistema se estructuró como una posible continuación de este trabajo a largo plazo.

Otra de las aplicaciones de este sistema son las siguientes:

La habilidad de demostrar antígenos específicos en la amibiasis activa puede ayudar al estudio de la epidemiología en esta enfermedad al poderse seguir de esta manera el curso del tratamiento ⁽⁴³⁾

Algunos autores han hecho algunos estudios en base a esto utilizando los sistemas desarrollados por ellos y que nos muestran ejemplos de que lo arriba expuesto es posible.

En 1982 ⁽⁴⁴⁾ se encontró una diferencia significativa entre los niveles de CIC pertenecientes a pacientes africanos comparados con los niveles de los pacientes italianos, siendo mayor el nivel en el caso de los primeros pacientes. En esta experiencia se usó como indicador la fijación del componente C_{1q} del complemento por parte de los complejos inmunes.

Por otro lado en el mismo año se logró ver la persistencia del antígeno amibiano en el suero de pacientes con AHA, utilizando un método muy parecido al nuestro; la persistencia se siguió durante 8 semanas en pacientes a los cuales se les estaba tratando para eliminar la enfermedad. De este modo se encontró que en 14 pacientes dos de ellos dejaron de mostrar el antígeno a las dos semanas del tratamiento y solo dos pacientes siguieron mostrando el antígeno amibiano después de 8 semanas de tratamiento aunque ya no mostraban signos de la enfermedad. ⁽⁴⁵⁾

BUSQUEDA DE UN AC CONTRA RECEPTOR DE INF γ EN EL SUERO DE PACIENTES CON LES

El LES es una enfermedad con anomalías inmunológicas, lo que redundó en una enfermedad de etiología desconocida que afecta múltiples órganos. Las manifestaciones clínicas más comunes en esta enfermedad (artritis, dermatitis, vasculitis y glomerulonefritis) están todas asociadas con la deposición de complejos inmunes, por lo tanto también se considera esta enfermedad como caracterizada por una hiperproducción de anticuerpos contra diferentes antígenos (74,11,20)

Por la multiplicidad de estos defectos inmunes en la enfermedad, una gran cantidad de investigadores han llegado a pensar que pueden estar implicadas anomalías en las linfocinas y en especial en el INF, (74,20,30,22,9,60,11,20) esto ya que el INF regula la blastogénesis de las células T y B, la producción de anticuerpos, la actividad celular citotóxica, la producción de anticuerpos, la actividad celular citotóxica, la función celular supresora y la densidad de antígenos superficiales de las células; siendo muchas de estas acciones parecidas a las anomalías vistas en el LES.

Estos datos nos orientan a encontrar bases para la teoría de que el INF pueda estar implicado en esta enfermedad.

La literatura científica tiene otras observaciones sobre el posible papel del INF en el LES. (74) Por ejemplo:

Estudios iniciales mostraron concentraciones elevadas de especies no definidas de INF en pacientes con LES, en especial en pacientes con enfermedad activa. (74,20) Es más, se ha encontrado un INF o el cual es ácido lábil, igual que el INF inmune. (74)

También se ha identificado un incremento en la adenilato 2'.5' sintetasa inducido por INF en células mononucleares de pacientes con LES. Por otro lado, en el LES murino, se han observado

concentraciones normales de INF y en linfocitos MRL-1 estimulados con Concanavalina A (Con A) a pesar de los valores bajos de IL-2 en cultivos similares.^(74,70,11,30,20) y como se sabe la IL-2 es necesaria para la producción del INF y.⁽⁷⁰⁾

Linfocitos estimulados con Con A de todas las subcepas con lupus en las primeras etapas de la vida, producían concentraciones más bajas de INF y en comparación con testigos normales.⁽⁷⁴⁾

Un dato que da pie a nuestra teoría es el que ratones NZB/W tratados con inductores de INF y o INF α mostraron una enfermedad acelerada que se manifestó por muerte y glomerulonefritis más tempranas; encontrándose remisión de la enfermedad por acción de anticuerpos contra INF y α .^(74,20)

Esto se ve apoyado por el dato de que el INF puede provocar linfoproliferación de macrófagos Ia⁺ los cuales activan a su vez linfocitos T.⁽¹⁶⁾

Ahora trabajando sobre esta premisa se ha intentado llegar a conocer la identidad del tipo de INF el cual puede actuar en el LES; por los datos antes mencionados podríamos pensar que el INF α está aumentado en el LES (tanto en su forma clásica, como en la inestable a pH < 2) y el INF γ está en cantidad normal o un poco baja. La cuestión es el que el INF γ es aproximadamente 250 veces más potente en su acción inmunorregulatoria que el INF tipo 1 y los niveles de INF α son a lo más 4 veces mayores que los de INF γ en el suero de los pacientes, lo cual se aleja mucho de este dato. Por ejemplo en 1981⁽¹⁸⁾ se encontró que el tratamiento de ratones híbridos de la cepa (NZB-NZWDF₁ con 3.3×10^6 unidades de INF 1 resulta en un incremento en la incidencia de glomerulonefritis y muerte, a comparación de las 8.7×10^3 unidades del tipo II necesarias para obtener un efecto similar.⁽¹⁸⁾

Aunque en 1987 otros autores proponen que la localización de niveles altos de INF γ en el LES, localizados en los órganos linfoides, pueden dar reacciones inmunes in vivo⁽³⁰⁾, la

única explicación posible del efecto del INF y cuando se encuentra en concentraciones normales o poco bajas podría ser la existencia de un anticuerpo contra el receptor de INF y en el suero de estos pacientes, el cual pueda modificar la cantidad (en cuanto a acción fisiológica) del INF y.

Al competir con el INF y por su sitio de unión en la superficie celular, la adherencia del anticuerpo podría producir una diversidad de efectos como se ha visto en otras enfermedades autoinmunes⁽⁷⁴⁾.

1) Bloqueo de la función por la degradación acelerada del receptor como es el caso de la Miastenia gravis

2) Limitación de la actividad de un receptor normalmente estimulado, como es el caso de la enfermedad de Graves y en el caso de la Acantosis nigricans con Diabetes.⁽⁵⁵⁾

Por ejemplo en 1988 en USA reportó el caso de una mujer que presentaba las características clínicas del LES y una severa hipoglucemia, esta paciente presentaba anticuerpos contra el receptor de insulina, no encontrándose otra causa para su hipoglucemia.

El tratamiento con corticosteroides a altas dosis resultaron en una restauración de la euglucemia.⁽⁶⁴⁾

En el presente trabajo se planteó como uno de los objetivos el llegar a un sistema capaz de detectar este anticuerpo en pacientes con LES; los resultados obtenidos sugieren la presencia de este anticuerpo en el suero de los pacientes analizados (ver punto V.2.7.2.2.1 de resultados).

Para este efecto se contó con un Ac de conejo contra IgG de humano inmunopurificado, el cual tenía los niveles de especificidad y sensibilidad requeridos para el ensayo.

Por el grado de sensibilidad de nuestro anticuerpo y dado que que en los pacientes con LES la absorbancia promedio de la dilución 1:50 fue de aproximadamente 0.3, podríamos llegar a pensar que de

existir este anticuerpo en el suero de los pacientes, tal vez estaría a una concentración de 31.25 $\mu\text{g/ml}$ en el suero de los pacientes.

Como se observa en las figuras 18 y 19 este ensayo parece indicar que a todas las diluciones en una gran mayoría de los sueros de los pacientes se encuentran diferencias significativas en relación a su absorbancia promedio contra el grupo control, esto nos hace pensar en la posible existencia del anticuerpo dirigido contra el receptor de INF y humano. La presencia de este anticuerpo podría ser indicativo del grado de actividad de la enfermedad en los pacientes.

Es una lastima el no conocer muchos de estos sueros lo cual vendría a confirmar esta suposición al conocer la gravedad de la enfermedad sufrida por los pacientes cuyo ensayo presenta mayor absorbancia (y tal vez mayor cantidad de anticuerpo). Como son los pacientes 3316, 3362, 3349; o bien la de los pacientes que no logran diferenciarse del valor medio de los controles (por ejemplo el 3356, 3324). Tal parece que dos sueros tuvieron a una dilución de 1/500 una absorbancia menor incluso que la media de los controles, es decir que salen por el extremo izquierdo (o menor) de los intervalos de confianza a todos los niveles de significancia a esta dilución, nosotros no podemos encontrar un significado clínico a esto.

Estos resultados todavía no son concluyentes sobre la existencia del citado anticuerpo, es menester hacer en el futuro algunos experimentos confirmatorios.⁵

Ya que nuestros resultados nos orientan hacia la existencia de este anticuerpo es válido hacer algunas especulaciones sobre el posible papel de este anticuerpo en la enfermedad.

⁵ ver sección de perspectivas.

1.-EXISTENCIA COMO UN ANTICUERPO ANTI IDIOTIPO.

Despues del descubrimiento en 1963 en forma independiente por Kunrel y Ovdin de la capacidad de un organismo de producir un anticuerpo dirigido contra otro y en 1974 la proposición de Jerne de la red idiotipo-anti idiotipo; se ha intentado dar muchos fenomenos autoinmunes la explicación de defectos en la red idiotipo-anti idiotipo. (7a,2a)

En el LES se han reportado la existencia de este tipo de anticuerpos, en especial contra anticuerpos anti DNA con Idiotipos, que van desde el 0-81, el Id-LL9 y en especial contra el idiotipo público Id-16/8. (31,40,44)

Es más, Abdou Et al⁶, encontraron que existen altas concentraciones de anticuerpos anti-idiotipo pertenecientes a anticuerpos dirigidos contra DNA presentes en el suero de pacientes con Lupus en remisión.

Algunos autores sugieren que estos anticuerpos pueden interferir en la función regulatoria de los L_T y conducir hacia la producción de autoanticuerpos. (22,11,40)

Esto también puede ser cierto para el caso de anticuerpos contra idiotipos de anticuerpos contra interferon, los cuales pudieran ser producidos con el fin de inhibir la formación de los segundos (11,44)

Por lo menos se han encontrado anticuerpos contra INF α (aunque en solo un paciente de 40 sueros ensayados)⁽³⁵⁾ por lo que no es tan descabellado pensar en la existencia de un Ac anti Idiotipo contra un Ac anti INF γ .

La existencia de posibles anticuerpos contra INF γ podrían solo existir al principio de la enfermedad, tal vez si fuera cierta la teoría de que la etiología de esta enfermedad pueda ser un virus tipo C,⁽⁶⁾ el cual produzca una infección persistente que se

⁶ Mencionado en ref 24,44

comportamiento como un LES, con lo cual se produciría una deficiencia de complemento y se permitiría un aumento de inmunocomplejos los cuales inducirían la producción de INF y en cantidades anormales.⁽⁶¹⁾

Este anticuerpo anti-idiotipo podría mimetizar la acción del INF y al unirse a su receptor; esto se ha visto en anticuerpos anti-idiotípicos preparados contra la insulina bovina, los cuales imitan la acción de la insulina al unirse a sus receptores en tejidos y estimular su acción fisiológica.⁽⁷⁴⁾

Otros autores^(44,45) sustentan que los anticuerpos anti-idiotípicos tienen relación con nefritis severas vistas en el Lupus y consideran interesante la posibilidad de que ciertos autoanticuerpos anti-idiotípicos puedan por inmunoselección, aumentar la producción de autoanticuerpos patogénicos⁽⁴⁴⁾. Esta inmunoselección de idiotipos ha sido documentada en pacientes con neoplasmas de células B seguidos de tratamientos con anti-idiotipos heterólogos (Meeker et al 1985)⁷ y en ratones con enfermedad parecida al Lupus tratados con anti-idiotipos alogénicos (Hahn y Ebling 1983)⁸ buscando evidencia de promoción de nefritis por autoanticuerpos contra idiotipos.⁽⁴⁴⁾

Es más, en (1982)⁹ se inyectó a ratones BALB/c con lipopolisacáridos, demostrando la deposición en los glomérulos renales de complejos inmunes conteniendo un idiotipo específico (+15) y su respectivo anti-idiotipo.⁽⁴⁴⁾

⁷ referido en 44

⁸ idem

⁹ idem

2. -COMO ACTIVADORES POLICLONALES DE L₂

Se considera que la anomalía inmune más relacionada con la patogenia del LES es la hiperactividad de los L₂, esta hiperactividad está manifestada por un incremento en el número de células formadoras de anticuerpos, hiper gammaglobulinemia policlonal y producción de autoanticuerpos^(22,11,70). Los factores responsables de esta anomalía son pobremente comprendidos.

Modelos murinos nos hacen llegar a pensar en un defecto inherente a las células B, el cual las hace ser hiperrespondedoras a factores externos que activen a estas, o bien haber predisposición genética.^(22,11,29)

Por ejemplo Theofilopoulos y colegas¹⁰ han demostrado que las cepas NZB/w y BXsb de ratones desarrollan una proliferación y diferenciación de células B en respuesta in vitro a cambios en linfocinas y en signos activadores.

Esto podría ser aplicado al interferón ya que este puede actuar como un factor de diferenciación de células B (BCDF por sus siglas en inglés)^(22,74,50), además de que este puede acelerar el desarrollo de la enfermedad autoinmune en los modelos murinos del LES. El concepto dado arriba sobre el posible papel de un Ac anti-idiotípico, como el responsable del anticuerpo contra el receptor de INF y puede explicar mucho de esto.

Es cierto que el INF y durante algunas circunstancias puede suprimir la inmunidad humoral⁽⁸⁰⁾ y la mediada por células, pero también bajo otras circunstancias este puede aumentar la producción de anticuerpos^(71,22), la fagocitosis de macrófagos y la citotoxicidad de los linfocitos. El aumento de la producción de anticuerpos en el ratón por el INF tipo II es de 10-100 veces superior que el producido por el INF tipo I.⁽¹⁸⁾

Algunos autores^(80,74) dicen que el INF y produce activación o inhibición dependiendo de la dosis (altas dosis decrecen la

10

¹⁰ Mencionado en ref 22

producción de Ac's y dosis bajas la estimulan), del tipo de INF γ (ver adelante), el tiempo de administración relativo a los efectos biológicos medidos y la presencia de otros factores inmunomoduladores y hormonales.

En el LES también hay reportes contradictorios sobre esto, por ejemplo Golbus et al⁽²²⁾, reporta que el INF γ in vitro aplicado a células B de pacientes con LES, aumenta la producción de inmunoglobulinas y Braude y cols⁽¹¹⁾ dice que en condiciones ligeramente diferentes el INF γ suprime in vitro la síntesis y secreción espontánea de anticuerpos anti DNA por parte de los L_B de pacientes con LES, al igual que la síntesis inducida por la presencia del antígeno.

Las únicas diferencias entre estos 2 ensayos fueron el tiempo de incubación del INF γ con las células (en el segundo ensayo el tiempo fue de 16 días cuando en el primero es de 4 días con otros 5 días sin INF γ), y la purificación de los L_B (en el primer ensayo es más exhaustiva la purificación dejando solo en contacto con macrófagos a los L_B.)

En ambos casos se usaron INF γ purificado y otro recombinante a las mismas concentraciones (10-10 000 unidades/pozo.)

Hay otros muchos reportes contradictorios con este respecto, pero una gran proporción de los que dicen que el INF γ inhibe la producción de inmunoglobulinas no tienen otro remedio que el de admitir que el INF γ produce un aumento en la síntesis de RNA y que el INF γ es necesario para la producción de placas líticas en respuesta a eritrocitos de carnero por parte de L_B de estos pacientes. (27,75)

Un estudio más exhaustivo me ha llevado a pensar que es más factible la hipótesis de que el INF γ (y en este caso nuestro anticuerpo) aumenta la producción de inmunoglobulinas pero solo después de una previa sensibilización de estas células permitiendo que actúen en mayor grado a mitógenos^(10,22), además de que es necesaria la participación de macrófagos via IL-1 para este

efecto, lo cual ha sido reportado en 1981⁽¹⁸⁾ y en 1988⁽²²⁾ al ver que el INF γ falla al activar células B purificadas, aun de grupos hiperrespondedores de anticuerpos, además de que la producción de INF se elimina o decrece al quitar los macrófagos, lo mismo pasa con la producción de inmunoglobulinas.^(18,22)

3.- ACCIÓN SOBRE LINFOCITOS T

Otras de las características inmunológicas del LES es la baja actividad supresora de los L_T ; por ejemplo en 1983, encontraron que L_T supresores de pacientes con LES activados con el virus de Epstein-Barr no dan el decremento normal visto en las células formadoras de placa in vitro usando L_T autólogos, en contraste con los L_T normales.⁽⁷⁵⁾

Algunos autores^(11,20,20,20) presumen que las aberraciones inmunológicas asociadas con el LES, como es la hipergammaglobulinemia, autoanticuerpos, complejos inmunes, la blastogénesis de linfocitos deprimida, y la baja actividad supresora de los L_T , pueden ser mediadas en parte por el interferón inmune circulante (y como nosotros pensamos por el posible anticuerpo encontrado), esto ya que el INF γ , produce todas estas, y más, funciones.

Esta acción dada al interferón es una de las teorías o mecanismos inmunopatológicos de enfermedades autoinmunes, que es una baja actividad supresora, hiperactividad de células helper o por otro lado una resistencia de las células B a los mensajes supresores^(22,25), esto último tal parece que no es lo que ocurre en el LES como ha dicho Tsokos et al⁽⁷⁵⁾, al demostrar que los L_T formadores de placa in vitro, si acatan los mensajes supresores de L_T supresores alógenicos de pacientes sanos.

Otra acción del INF γ en los L_T podría ser el aumentar la actividad celular citotóxica, o bien el fenómeno de citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por las células^(55,60), lo cual es común en el LES y podría explicar muchos de los daños

observados en esta enfermedad.

Es muy posible que este anticuerpo no presente ninguna actividad de INF y es mas tal vez no este dirigido especificamente contra el receptor de INF y ya que actualmente se ha sugerido que el espectro de autoanticuerpos del Lupus puede no ser tan amplio, puesto que los anticuerpos mononucleares anti DNA derivados del hombre y del ratón con LES, reaccionan con muchas sustancias, (como es la cardiolipina, ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, factor anticoagulante del Lupus, polinucleótidos) cuyas estructuras contienen grupos fosfatos enlazados como diesteres. Entonces determinados autoanticuerpos pueden unirse a un epitope que contiene fosfodiésteres, presente en diversas moléculas biológicas distribuidas ampliamente en todo el organismo. (74)

Este anticuerpo aunque no presentara ninguna actividad parecida al Interferon y podría causar muchos de los daños vistos en el LES ya que al unirse a los linfocitos podría encontrar en la gama de anticuerpos antilinfocitos vistos en esta enfermedad, la actividad citotóxica en estos pacientes es un hecho. (74,80)

El mecanismo de acción de estos anticuerpos en la destrucción de los linfocitos podría ser el siguiente:

Los anticuerpos en presencia de complemento (el cual se encuentra en baja concentración pero existe), pueden interferir con la tipificación de los HLA y con ciertas actividades funcionales como es la respuesta proliferativa a los aloantígenos. Estos anticuerpos pueden ser liberados de la superficie de las células T en forma de inmunocomplejos, engrosando la gamma de estos vista en la enfermedad, y como tales pueden bloquear la acción de estos linfocitos o contribuir con el depósito de complejos que conducen a la vasculitis y nefritis. Esto también podría explicar el aumento de la reacción dada en una mezcla de linfocitos mixtos vista en la enfermedad en cuestión. (74,70)

4. COMO INDUCTOR DE ANTIGENOS MHC

Un último punto a discutir es la relación de este posible anticuerpo con el sistema HLA y la influencia del aumento de antígenos de histocompatibilidad dada por el INF en relación con el LES.

El Interferon aumenta en gran medida la expresión de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC):

Los clase I humanos: HLA-A, B, C y β -microglobulina, los de clase II o los antígenos Ia de ratón, los de clase III o del complemento y antígenos factor B expresados por fagocitos mononucleares; de la misma manera aumenta la expresión de receptores Fc en la superficie celular. ^(61,94)

Esta capacidad puede afectar la inmunidad mediada por células. ⁽⁷⁴⁾

Como se ha dicho en Generalidades muchos procesos autoinmunes están asociados con una inapropiada expresión de moléculas MHC en especial de clase II; en el LES hay una gran asociación con los antígenos HLA DR-2 y 3 (75%) ^(20,22,74) y algunos autores han asociado los niveles encontrados de INF y con la expresión anómala de estos antígenos (en especial en pacientes con eritema). ^(89,22)

Actualmente (1988) ⁽²²⁾ se ha encontrado una asociación entre el HLA cw 7 y pacientes hiperresponsivos al INF y, en cuanto a su producción de inmunoglobulinas, con respecto al LES.

Es interesante hacer notar que el HLA cw 7 es un desequilibrio de unión de los serotipos HLA DR 2 y 3. ⁽²²⁾

En 1990 Kawakami ⁽⁷⁶⁾ asocio la expresión de antígenos MHC II en ratones y una tiroiditis producida por autoanticuerpos. Encontró que la administración de INF y en ratones induce la producción de moléculas MHC II en las células foliculares (visto por inmunoquímica indirecta) y una baja de las hormonas T_3 y T_4 séricas, la producción o presencia de antitiroglobulinas y anticuerpos antimicrosomales, sugiere que la producción de los antígenos MHC II inducen estos anticuerpos, esto es muy posible que pudiera pasar en el LES.

En el caso del LES murino, anticuerpos contra el antígeno Ia produce remisión de la enfermedad (Edelman 1983)¹¹.

Es más, el que el MHC está presente en el cromosoma B y que Rassibargi¹² y por otro lado Jung⁽³⁴⁾ reporten que el gene para la expresión especie-específica del receptor de INF y este localizado en este mismo cromosoma es de gran relevancia.

Otro hecho importante es el descubrimiento de Le Bouteillier y cols⁽⁴³⁾ de que en pacientes con LES se han encontrado anticuerpos contra dos proteínas reguladoras [llamadas HLA F1 (65 kDa) y HLA F2 (88 kDa)] de una secuencia inducida por el INF y para la expresión del Ag HLA A2.-una proteína clase I- (HLA-A2-ICS por sus siglas en inglés). Esta propiedad persiste después de la absorción de los sueros de los pacientes con LES en una columna de afinidad con DNA diferente a los nucleótidos del HLA-A2-ICS.

Con estas elucubraciones del papel patógeno de nuestro anticuerpo encontrado en la enfermedad autoinmune LES no queremos decir que este sea la etiología de esta enfermedad, nosotros consideramos que simplemente es otra de las manifestaciones inmunológicas presentes en el LES.

11 Mencionado en ref 10

12 Mencionado en ref 22

PERSPECTIVAS

Los resultados de esta tesis todavía pueden ser complementados para lo cual proponemos las siguientes investigaciones para un futuro:

A) En el caso del sistema "Detección de antígeno ambiano circulante en el suero de pacientes con AHA"

1) Actualmente se está intentado radiomarcarse el anticuerpo de conejo específico para *E. histolytica*, en un intento de aumentar su sensibilidad.

2) Diseñar un método más "limpio" que el de precipitar inmunocomplejos con polietilenglicol, para concentrar el antígeno ambiano a partir del suero de los pacientes.

3) Obtener otro suero de conejo contra *E. histolytica* con un título de anticuerpos mayor a 1/2000 (El "banco" de sueros utilizados en esta tesis tenía un título aproximado de 1/1600 (dato no mostrado) lo cual implica que era muy bajo) y tratamiento de éste.

B) En el caso del sistema de "Busqueda de un anticuerpo contra el receptor de INF y en el suero de pacientes con LES".

1) Determinar si este anticuerpo es en realidad contra el receptor de INF y por medio de inmunoblot al transferir un corrimiento electroforético de receptor purificado y ver que el anticuerpo reacciona contra la banda del receptor.

2) Determinar si a este anticuerpo se le puede considerar un Ac anti idioma por medio de columnas de afinidad las cuales tengan acoplados los distintos anticuerpos que originan al anticuerpo C

El Ac contra INF γ , por ejemplo)

3) Determinación de su actividad:

En un sistema para la determinación de la actividad biológica del INF γ poner el suero de alguno de los pacientes en títulos altos (por ejemplo el 3318) y probar una cantidad de INF γ , pudiéndose encontrar dos opciones:

- a) El título del suero que inhiba un 50% de la actividad de INF γ .
- b) Si el anticuerpo mimetiza la acción de un receptor activado por INF γ , ver el título del suero que aumente un 50% la actividad de INF γ .

4) Probar en el sistema el Ac solamente, es decir, sin INF γ .

VII.-CONCLUSIONES

VII.- CONCLUSIONES

El Ac de carnero anti IgG de humano . en las condiciones trabajadas, no da una aparente inespecificidad, por lo tanto se puede considerar como específico, de un gran título y una sensibilidad conveniente contra IgG humana.

Los grados de sensibilidad y especificidad del Ac de conejo anti *E. histolytica* no fueron convenientes en el ensayo ideado para su actividad.

Los datos presentados en el punto V.2.7 sugieren la presencia de un anticuerpo contra el receptor de INF γ en el suero de algunos pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico.

Los resultados obtenidos sobre el Inmunoensayo de "Detección de Antígeno Ambiental circulante en el suero de pacientes con AHA", todavía no son concluyentes sobre la presencia de éste en los pacientes.

VIII

APENDICES

- **A) MICROMETODO DE DETERMINACION DE PROTEINAS**
- **B) PRUEA RAPIDA DE DETECCION DE PROTEINAS POST-ELUCION EN COLUMNA POR EL METODO DE BCA**
- **C) PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL DESARROLLO DEL ANALISIS INMUNOENZIMATICO EN FASE SOLIDA**

ELISA

APENDICE A

MICROMETODO DE DETERMINACION DE PROTEINAS

I.-CUANTIFICACION DE PROTEINAS CON EL REACTIVO DE ACIDO BICINCONONICO (BCA)

1.-SOLUCIONES

a) Solución de ácido Bicinconónico (sal disódica, PIERCE) al 4% en agua desionizada. 5 ml de BCA al 4% equivale a 0.2 gr de BCA en 5 ml de agua.

b) Solución reactiva A. - 200 μ l de CuSO_4 4% en los 5 ml de BCA 4%, con agitación vigorosa para disgregar el precipitado verde formado.

c) Solución reactiva B. - Mezclar la solución reactiva A con 5.2 ml de microreactivo A [Na_2CO_3 1.6%, NaOH y 1.6% de tartrato de sodio pH=11.25 (ajustado con NaHCO_3)] con agitación.

d) Estándar de Albúmina sérica bovina 500 μ g/ml

2.-MATERIAL

a) Caja para ELISA

b) ASF

c) Lector de ELISA (Lab Systems Uniskan II) con filtro de 560 nm.

3.-METODO

a) Se puso una fila de ASF (100 μ l) como blanco.

b) Se acortó una curva patrón en cada experimento de la sig. forma:

i) El estándar de albúmina se diluyó a 100 μ g/ml en ASF.

ii) Con el estándar se hizo la curva patrón, con 8 diluciones de la albúmina por duplicado (10-80 μ l que equivale a 1-8 μ g de proteína por pozo).

c) Se puso en cada experimento la muestra problema en 3 diluciones

diferentes por triplicado (concentrados 1/10 y 1/100) de tal forma que la cantidad de proteína entrara en el rango de proteína de la curva.

d)A cada pozo se le adiciono el volumen necesario de ASF para aforar a 100 μ l

e)Adicionar a cada pozo 100 μ l de solución reactiva.

f)La caja se incubó por 2 hrs a temperatura ambiente.

g)Los pozos se leyeron en el espectrofotometro de ELISA a 560nm, usando como blanco lo pozos con ASF. (72)

La grafica 20 nos presenta una curva patrón promedio característica de este procedimiento.

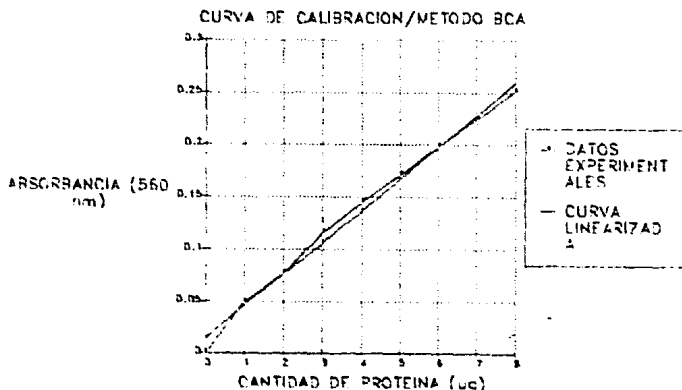


Fig 20.-Curva patrón para la determinación de proteínas por el método de BCA usando como estándar Albumina Sérica Bovina 100 μ g/ml. Dado que en cada experimento se hizo esta curva la curva presentada es el promedio de 10 determinaciones. En esta grafica se presentan los datos sin linealizar y linealizados los resultados usados en esta tesis se obtuvieron de la curva linealizada

II.-DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE FOLIN

1.-SOLUCIONES

a) Reactivo alcalino (5 ml). -5 ml del reactivo A (carbonato de sodio al 2.5% y NaOH 0.125 N) se mezclaron con 100 ml de una solución 1:1 de la solución B con la B' [Solución B: 1.25% de CuSO_4 , solución B': 2.5% de tartrato de sodio (J.T. Baker)] b) 500 μl del reactivo de Folin. -300 μl del reactivo de fenol Folin-Ciocalteu se diluyó con 300 μl de ASF. c) Estándar de Ovalbúmina 1 mg/ml

2.-MATERIAL

a) Caja de ELISA
b) ASF
c) Lector de ELISA con filtro de 692 nm

3.-METODO

a) La primera fila se usó como blanco poniendo 16 μl de ASF.
b) En cada experimento se montó una curva patrón usando el estándar de ovalbúmina 1 mg/ml, poniendo en los pozos por duplicado de 1-8 μl del estándar, lo cual equivale a 1-8 μg de proteína.
c) Las muestras problema se diluyeron por duplicado, de tal manera que un volumen menor de 16 μl contenga una cantidad equivalente a 1-8 μg de proteína.
d) Cada pozo se agregó a 16 μl de volumen con ASF.
e) En cada pozo se adicionaron 160 μl de la solución alcalina y se esperó por 15 min.
f) Pasado este tiempo se puso 16 μl del reactivo de Folin diluido dejando incubar por 30 min a temperatura ambiente, basado en ref. (3).

g) Pasado este tiempo se leyó la caja en un lector de ELISA a una $\lambda=690$ nm, usando como blanco los pozos de ASF.

La gráfica 21 muestra una curva patrón promedio usando esta técnica.

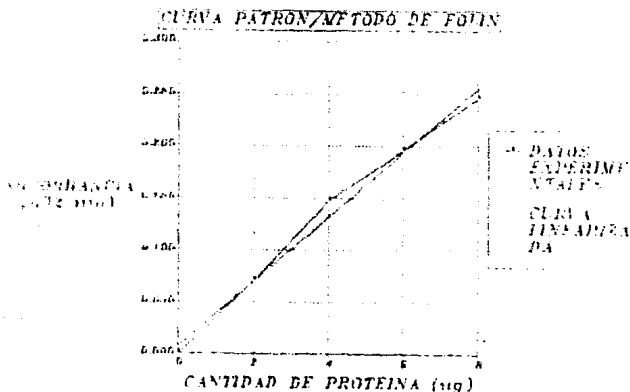


Fig 21.-Curva patrón para la determinación de proteínas por el método de Folin usando un estándar de Ovalbúmina 1 mg/ml. En cada experimento se hizo esta curva patrón, por lo tanto esta curva es el promedio de 5 experimentos. En esta gráfica se presentan los datos sin linealizar y linealizados los resultados usados en esta tesis se obtuvieron de la curva linealizada.

En la presente tesis se contó con estos 2 métodos de determinación de proteínas, usándose con mayor frecuencia el método del ácido bicromónico ya que no se ve interferido por detergentes ni inhibido por algunos amortiguadores salinos usados en esta tesis; además de que no se pudo usar también para un formato de determinación de proteínas postcolumnas.

En algunas ocasiones (marcado en material y metodos) se usó el metodo de Lowry expuesto; en estas condiciones se recurrio a este método cuando se necesitaba el resultado en un tiempo relativamente corto para seguir con algun protocolo o bien en el caso de que la muestra problema contuviera algún aminoácido libre en la mezcla proteica que interfiriera con el metodo de BCA (como lo es la glicina).⁽⁷²⁾

APENDICE B

PRUEBA RAPIDA DE DETECCION DE PROTEINAS POST-ELUCION EN COLUMNA POR EL METODO DE BCA

En este apéndice se da una prueba cualitativa para la detección rápida de un pico de proteínas eluido de una columna cromatográfica utilizando el método de determinación de proteínas del BCA.

La mayoría de estas cromatografías se realizan en cuartos refrigerados para evitar desnaturalización de proteínas o en el caso del Ag ambiente: la activación de proteasas que puedan digerir las proteínas eluidas; este método evita el tedioso procedimiento que hay que usar en estos casos cuando no se cuenta con un detector de proteínas acoplado al colector de fracciones, ya que el método al poderse llevar a una caja de ELISA, puede ser llevado a donde sea.

SOLUCIONES Y MATERIAL

Ver la sección correspondiente del Apéndice A para el método de BCA.

MÉTODOS.-

a) Como blanco se utilizó 100 μ l de ASF en la primera fila.

b) 10 μ l de cada tubo obtenido de la cromatografía se pusieron en cada pozo de la caja de ELISA, previamente marcados los pozos con el número correspondiente al tubo en cuestión.

c) 50 μ l de agua desionizada se adicionó a cada pozo.

d) A cada pozo se le agregó 100 μ l de la solución reactiva, homogeneizando la mezcla.

Cuando no se cuenta con tiempo para ver el desarrollo de color en

De 2 a 5 minutos despues se podia ver el desarrollo de color en los pozos con una cantidad de proteina importante (basado en ref 72)

La grafica 22 compara este metodo con otro metodo muy comun en estos casos, la absorcion de las proteinas a 280 nm², observandose que dan resultados practicamente iguales, siendo el metodo de BCA mas rapido y practico (5 minutos para el metodo de BCA y minimo 15 minutos para el segundo metodo).

este paso se puede ver una decoloracion del reactivo (Normalmente de color verde) en los tubos que contienen una cantidad de proteina todavia considerable.

² Este metodo suele ser mas usado por su naturaleza semiquantitativa al dar 1 mg/ml de inmunoglobulina (en general) un coeficiente de extincion $E_{280nm}^{1\%1cm} = 1.000$

AC DE CONEJO ANTI E. histolytica INMUNOPURIFICACION

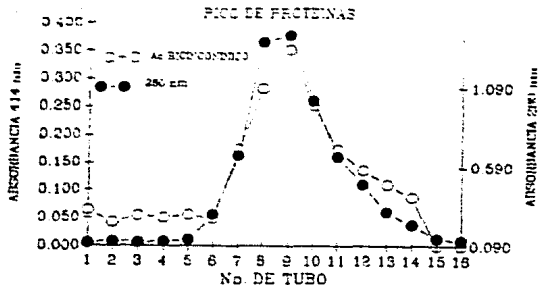


Fig 22. Muestra y compara el método expuesto en este apéndice con el método general usado en procedimientos post-columna y que es la determinación de la absorbancia dada por la proteínas a una $\lambda = 280$ nm las cuales están presentes en los tubos. La determinación mostrada es la elución con glicina 0.2 M pH 2.5 de los anticuerpos específicos de conejo contra ameba fijados a una columna de sacarosa 4B-E. histolytica.

APENDICE C

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL DESARROLLO DEL ANALISIS INMUNOENZIMATICO EN FASE SOLIDA (ELISA)

1.-Se forró la placa para ELISA (Nunc-Immunoplate,Maxisorp,Thomas Scientific) con Ag disuelto en un tampon de carbonatos (Baker) 0.1M pH 9.6⁽⁸¹⁾. Para antigenos purificados se uso una concentración de 5 µg/ml y para antigenos complejos o no purificados se usó 25 µg/ml.

- a) Se depositaron 50 µl por pozo,dejandose una fila como blanco.
- b) se incubó por 2 hrs a 37°C, o bien toda la noche a 4°C.
- c) el liquido sobrenadante se aspiró de los pozos usando vacio.
- d) La caja se lavó 6 veces con ASF usando un lavador de cajas de ELISA (Elcawash Brandray)

2.-50 µl de una solución de gelatina (Baker) al 0.5% en ASF se depositó en cada pozo con el proposito de saturar la superficie libre de los pozos.

- a) se incubo la caja por 1 hr a 37°C.
- b) El liquido se aspiró y se lavo la caja 6 veces con ASF-tween 20 (sigma) al 0.05%.

3.-Se agregaron diluciones del suero inmune diluido en ASF-tween 20 al 0.05%-gelatina al 0.5% a razón de 50 µl por pozo.

- a) Se incubo por 40 minutos a 37°C.
- b) El exceso no acoplado se lavo con ASF-tween 20 al 0.05% 6 veces consecutivas.

4.-El segundo anticuerpo (el cual estaba conjugado con un

marcador) se puso en una dilución apropiada en ASF-tween 20 al 0.05% y gelatina al 0.5% en volúmenes de 50 µl por pozo.

a) Se incubó por 40 minutos a 37°C.

b) El exceso no acoplado se lavó con ASF-tween 20 al 0.05% 6 veces .

5.- A cada pozo se le adicionó 100 µl de ABTS como sustrato. (100.40.81)

a) El sustrato estaba preparado de la sig. manera:

a) 11 ml de ABTS (ácido 2,2' azino bis (3-etil benzotiazolina)-6-sulfónico (Boehringer Mannheim GMBH)) a una razón de 137 mg./250 ml de un buffer de citrato-fosfato 0.32 M pH 4.2, se le agregó 11 µl de peróxido de hidrógeno al 30% (H₂O₂ Baker al 30%).

b) Se dejó reposar por 30 min.

c) Se leyó la caja en el lector de ELISA a una λ=415 nm.

Este es el protocolo general seguido en cada ensayo. Para cada ensayo se dan las correcciones particulares pertinentes.

IX.-BIBLIOGRAFIA

IX.-BIBLIOGRAFIA

- 1.-Affinity Chromatography. 1974. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala Sweden.
- 2.-Araujo R.F., Benavides M.L., Vega M.C. 1983. Tratamiento de la Amibiasis Crónica en Pacientes Pediátricos con una Suspensión de Quinfolida. Clin. Therapeutics 6(1)
- 3.-Arias N. S., M en C. 1990. Efecto del Suero Humano sobre *Entamoeba histolytica* en la Expresión de sus Actividades Fagocítica, Citoquímica y la Susceptibilidad a la Lisis por Complemento. Tesis de Doctorado. Departamento de Biología Celular. CINVESTAV IPN, México.
- 4.-Avila M. E. E. 1986. Marcadores Antigenicos Distintivos de Especies de *Entamoeba*. Tesis de Doctorado. Departamento de Biología Celular. CINVESTAV IPN, México.
- 5.-Avila M. E. E. 1982. Identificación de las Proteínas de la Membrana Plasmática y del "Cap" Inducido por Anticuerpo en *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestría. Departamento de Biología Celular. CINVESTAV IPN, México.
- 6.-Avrameas S. and T. Ternynck. 1971. Peroxidase Labelled Antibody and Fab Conjugates with Enhanced Intracellular Penetration. *Immunochemistry*. 8. 1175-1179.
- 7.-Axen, R. J. Porath, and S. Ernback. 1967. Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides. *Nature*. 214:1302-1304.

- 8.-Bach Jean-Francois;Philippe L. 1983 Inmunologia. Fondo Editorial Masson. España.
- 9.-Barret T.J. 1978. Inmunologia Básica y su Aplicación en la Medicina. Ed.Médica Panamericana. Argentina.
- 10.-Boyd.A.W. 1987 Preexposure of Resting B Cells to Interferon γ Enhances their Proliferative Response to Subsequent Activation Signals. Cell. Immunol. 106:355-365.
- 11.-Braude A.I., M. C.Hochberg. 1988. In vitro Suppression of anti-DNA Antibody and Immunoglobulin Syntesis in Systemic Lupus Erythematosus Patients by Human Gamma Interferon. J.Pharmathol. 15:439-444.
- 12.-Butt.W.R. Editor.1984. Practical Immunoassay. Marcell Dekker.Inc. USA.
- 13.-Campbell. 1951. Immunologic Adsorbents I.-Isolation of Antibody by Means of a Cellulose Protein Antigen. Proc. Natl Acad.Sci. 37:575-578.
- 14.-Chaim.O. Jacob Ph.Van der Meide. and Hugh O.M. de Vitt. 1987 In vitro Treatment of (NZB x NZW)F1 Lupus-Like Nephritis With Monoclonal Antibody to γ Interferon. J.Exp. Med. 166:798-803.
- 15.-Chomatography Electrophoresis immunochemistry. 1989 Molecular Biology. HPLC. Catálogo O. Bio-Rad
- 16.-Cuello.A.C. Editor. 1984. Immunohistochemistry. John Willey and Sons. Great Britain.

- 17.-Diamond L.S. 1978. A New Medium for Axenic Cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:43.
- 18.-Engleman G. E., G. S. 1981. Treatment of (NZB/NZW)F1 Hybrid mice with *Mycobacterium bovis* strain BCG or Type II Interferon Preparations Accelerates Autoimmune Disease. Arthritis. Rheum. 24:1396-1402.
- 19.-Gandhi M. B. 1985. Amebic Liver Abscess and Circulating Immune Complexes of *Entamoeba histolytica* Proteins. Am. J. Med. Hyg. 39(5):440-444.
- 20.-Garcia S. A. 1987. Importancia de los Haplotipos del Complemento (Complotipos) y del Gen de CIO 1 en la Etiología del Lupus Eritematoso Generalizado. Tesis de Licenciatura FES-C. UNAM.
- 21.-Gillin F.D., Reiner S.D., Pavdin I J. MD Editor. 1988. Amebiasis. -Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Capitulo 27. John Wiley and Sons. Inc. USA
- 22.-Golbus J., M. S. 1988. Increased Immunoglobulin Response to γ Interferon by Lymphocytes from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Immunol. and Immunopathol. 46:129-140.
- 23.-Goodman W.J., Stites D.P. Editor 1988. Inmunología Básica y Clínica. Capitulo 4. 8ª Ed. El Manual Moderno. México.
- 24.-Guesdon J., T. Ternynck and S. Avrameas. 1979. The Use of Avidin-Biotin Interaction in Immunoenzymatic Techniques. J. Histochem. Cytochem. 28(8):1131-1139.

- 25.-Gutierrez N. G. 1984. Estudio del Efecto Citotoxico de los Macrofagos activados sobre *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestria. Departamento de Biología Celular. CINVESTAV IPN. México.
- 26.-Hatfield M., Evans M., Suenaga R., Hassaheim K.M. 1987. Anti-Idiotypic Antibody Against Anti DNA in Sera of Laboratory Personnel Exposed to Lupus Sera or Nucleic Acids. Clin. Exp Immunol. 70:28-34.
- 27.-Hernandez V. R., Onofre M., Mirna J.C. 1982. Identificación de Antígeno Ambiental Circulante en el Hombre por Análisis Inmunoenzimático. I.-Desarrollo de la Técnica. Arch. Invest. Med. (Mex). 13(supl 3):297
- 28.-Hobart M.J. and I. Mac.Conhelli. 1978. The Immune System. Blackwell Scientific Publications. Great Britain.
- 29.-Hooks J.J. PhD. Haralampos M. 1979. Immune Interferon In the Circulation of Patients with Autoimmune Disease. New Engl. J. Medicine. 301(1):5-8
- 30.-Ibarra P. J. M. 1990. Eliminación de Proteínas Absorbidas en la Membrana de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Licenciatura para Químico Farmacéutico Biólogo. FESC UNAM.
- 31.-Jawetz E., Melnick L., Adelberg A.E. 1983. Microbiología Médica. Ed El Manual Moderno. 10ª Ed. México.
- 32.-Jalan K.N., Maltra T.K., Ravdin I J. MD Editor. 1988. Amebiasis.-Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Capítulo 34 John Wiley and Sons. Inc. USA

- 33.-Joyce P.M., Ravdin I J. MD Editor. 1986. Amebiasis.-Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Capitulo 8. John Wiley and Sons. Inc. USA
- 34.-Jung V Rashid, Baigi A., Jones C., Tischfiel A. J., Pestka S. 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:4151-4158
- 35.-Kawakami Y., Kuzuya N. 1990. Induction of Experimental Thyroiditis in Mice by Recombinant Interferon γ Administration. Acta Endocrin (Copenh.). 122L : 41-48
- 36.-Kean B.H., Ravdin I J. MD Editor. 1986. Amebiasis.-Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Capitulo 1. John Wiley and Sons Inc. USA
- 37.-Kearl H.J. 1985. The Indirect Effect Of Interleukin 1, Interleukin 2, Interferon α , Interferon γ , B-cell Growth factor, and a B-cell Differentiation Factor on resting and Activated Human B-Cells. Cellular Immunology 96:36-46
- 38.-Kenneth H.F., Kenneth E.S., Sites D.P. Editor 1988. Immunologia Basica y Clinica. Capitulo 21. 8^a Ed. El Manual Moderno. Mexico.
- 39.-Kim T., Kanayama Y. 1987. Serum Levels of Interferon in Patients with Sistemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 70:562-569
- 40.-Lane, D. 1985. Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.

- 41.-Le Bouleiller F.,N.Auphan.1989. Antibodies to HLA Class I Promoter-binding Proteins in Sera from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Eur. J. Immunol. 19:735-739
- 42.-Lievano.M.A.,Avila E.E.,Roman M.,and Calderón J. Immunoreactivities for *Entamoeba histolytica* in Patients with Amebic Liver Abscess. Supl Arch Inv. Med. En prensa.
- 43.-Lowry H.O.,Rosebrog.N.J.,Farr L.A. and Randall R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J.Biol. Chem. 193:265-275
- 44.-Mackworth Y. L.G.,Schwartz R.S. 1988. An Idiotype-specific Autoantibody in SLE. Clin. Exp. Immunol. 71:56-61
- 45.-March S.C,Parikh T., and Cuatrecasas P. 1974. A Simplified method for Cyanogen Bromide Activation of Agarosa for Affinity Chromatography. Annal. Biochem. 60:149-152
- 46.-Mendlovic.S.,Fricke H.,Shicenfed Y. and Mozes E. 1989. The Role of Anti-Idiotypic Antibodies in the Induction of Experimental Systemic Lupus Erythematosus in Mice. Eur. J. Immunol. 79:729-734
- 47.-Mohimen A.,Maitra T. 1989. A Specific Solid-Phase Assay for the Detection of Immune Complexes Containing *Entamoeba histolytica* Antigens. J. Immunological Methods. 117:39-44
- 48.-Molier D.E. MD,Rather R.E MD,Taylor S.I.MD,PhD. 1988. Autoantibodies to the Insulin Receptor as a Cause of Autoimmune Hypoglycemia in Systemic Lupus Erythematosus. Am. J. of Med. 84:334-338

- 49.-Montoya A. and J.V.Castell. 1987. Long Term Storage of Peroxidase-Labelled Immunoglobulins for Use in Enzyme Immunoassay. J. Immunological Methods. 99:13-20
- 50.-Muñoz M. Ma.de L. M en C. 1986. caracterizacion de la Actividad Colagenolitica de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Doctorado. Departamento de Biología Celular. CINVESTAV IPN.
- 51.-Muryoi T. Dasaki T.,N.Harata ,R.Koshinaga. 1988. Heterogeneity of Anti-Idiotipe Antibodies to Anti-DNA Antibodies in Humans. Clin. Exp. Immunol. 71:67-72
- 52.-Navarrete A. A. B. 1986. Estudio por Inmunofluorescencia de la Interacción de *E. histolytica* con Anticuerpos Monoclonales. Tesis de Licenciatura para Químico Farmacéutico Biólogo. ENEP Zaragoza. UNAM.
- 53.-Norris M.S.,Ravdin I J. MD Editor. 1988. Amebiasis.-Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Capítulo 44. John Wiley and Sons. Inc. USA.
- 54.-Nuti M.,R. D'amelio. 1982. Circulating Immune Complexes in Amebiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hig. 76(4):587-589
- 55.-Oppenheim J.J., Ruscetti F.W., Faltynet C.R., Stites D.P. Editor 1988. Inmunología Basica y Clínica. Capítulo 8. 5ª Ed. El Manual Moderno. Mexico.
- 56.-Panem S.,Check J. I.. 1982 Antibodies to α Interferon in a Patients with Systemic Lupus Erythematosus. J. Immunol. 199(1) 1-3

- 57.-Perez R. A. Definición de Especificidades Inmunes Anti-Amiba en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida que Padece Amibiasis Hepática o Intestinal en Comparación con no Infectados por el VIH. Tesis de Licenciatura en Biología. ENEP Iztacala, UNAM En Prensa
- 58.-Pick E. Editor. 1981. Lymphokines 3. Academic Press. USA.
- 59.-Pillai Shiv.A. Mohimen. 1982. A Solid-Phase Sandwich Radioimmunoassay for *Entamoeba histolytica* Proteins and the Detection of Circulating Antigens Amoebiasis. Gastroenterology. 83:1210-1216.
- 60.-Ralls W.P., Colletti P.M., Halls J.M., Ravdin I J. MD Editor. 1988. Amebiasis.-Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Capítulo 42. John Wiley and Sons. Inc. USA
- 61.-Ravdin I.J., Guerrant L.R. Ravdin I J. MD Editor. 1988. Amebiasis.-Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Capítulo 50. John Wiley and Sons. Inc. USA.
- 62.-Ravdin I J. MD Editor. 1988. Amebiasis.-Human Infection by *Entamoeba histolytica*. John Wiley and Sons. Inc. USA
- 63.-Resano P. F., Trujillo A.J. 1982. Detección de Antígeno Amibiano por el Método de ELISA en el Suero de Pacientes con Absceso Hepático Amibiano. Arch. Invest. Med. (México). 13(supl 3):301

- 64.-Reyes C. J. L. 1983. Estudio Comparativo de varios Métodos de Serodiagnóstico de Amibiasis y Análisis Seroepidemiológico de Amibiasis y Análisis Seroepidemiológicos. Tesis de Licenciatura de Biología. ENEP Iztacala. UNAM
- 65.-Rose R. Noel., Friedman H., Faney L. J. 1986. Manual of Clinical Laboratory Immunology. Third Edition. Am. Soc. Micro. USA.
- 66.-Salata R. A., Ravdin I. J. MD Editor. 1988. Amebiasis.-Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Capitulo 28. John Wiley and Sons. Inc. USA
- 67.-Salata R. A., Ravdin I. J., Ravdin I. J. MD Editor. 1988. Amebiasis.-Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Capitulo 30 y 31. John Wiley and Sons. Inc. USA
- 68.-Sargeant P. G., Ravdin I. J. MD Editor. 1988. Amebiasis.-Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Capitulo 25. John Wiley and Sons. Inc. USA
- 69.-Sephadex Ion Exchangers. 1970. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala. Sweden
- 70.-Sibbitt W., Kenny C. Jr. 1984. Lymphokines in Autoimmunity: Relationship between Interleukin-2 and Interferon- γ Production in Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Immunol. and Immunopathol. 32:166-173
- 71.-Siegels D., Junning L. E. and Vicck J. 1988. Modulation of Lymphocyte Proliferation and Immunoglobulin Synthesis by Interferon- α and Type II Interferon. Cell Immunol. 101:880-901.

- 72.-Smith P.K., Krohn R.I. and D.C. Klenk. 1950. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. Analytical Biochem. 150:76-85
- 73.-The Enzotin, Biotinylating Reagent. Bionote P 401-01-8508
- 74.-Theofilopoulos A.N., Stites D.P. Editor 1988. Inmunología Basica y Clínica. Capítulo 11. 6ª Ed. El Manual Moderno. México.
- 75.-Tsokos C.G., McGrath T.Ian. 1983. Epstein -Barr Virus Induces Normal B cells Responses but defective Suppressor T cel Responses in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. J. Immunol. 131(4):1797-1801
- 76.-Vinayak. V.F.Purhima k., Katar S., Nain C.K. and Mehta S.K.. 1988. Specific Circulating Immune Complexes in Amoebic Liver Abscess. J.Clin.Microbiol. 23(6):1088-1090
- 77.-Walsh A.J., Ravdin I J. MD Editor. 1988. Amebiasis.-Human Infection by *Entamoeba histolytica*.Capítulo 8 John Wiley and Sons. Inc. USA
- 78.-Walsh A.J., Ravdin I J. MD Editor. 1988. Amebiasis.-Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Capítulo 48. John Wiley and Sons. Inc. USA.
- 79 -Wayne W.D. 1982. Bioestadística. Limusa. México.
- 80.-Ytterberg S.R., Schnitzer J.T. 1982. Serum Interferon Levels in Patients with Sistemic Lupus Erythematosus, Arthritis and Rheumatism 25(4):401-406
- 81.-Zouhair M. Editor. 1984. Molecular Immunology. Marce. Dekker, Inc USA