

11261
6
EJ 2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**PRODUCCION DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES (IgA) ESPECIFICOS PARA
*ENTAMOEBIA HISTOLYTICA***

TESIS

**Que para aspirar al grado de Maestro en Ciencias Biomédicas.
Disciplina Inmunología**

Presenta

Belem

PATRICIA MORAN SILVA

México, D.F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1993



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.

INDICE

| | |
|--|-----------|
| Resumen | 1 |
| Introducción | 2 |
| Material y métodos | 15 |
| Resultados | 24 |
| Discusión | 27 |
| Bibliografía | 33 |
| Bibliografía generada durante el desarrollo de esta tesis | 43 |
| Figuras | 44 |

RESUMEN

Ya que la amibiasis es una enfermedad adquirida primordialmente por la vía oral y su órgano blanco es la mucosa del colon, se puede pensar que al igual que en otros modelos biológicos, la IgA secretora anti*amibiana* pudiera tener un papel importante en el fenómeno de protección durante las etapas tempranas de la relación huésped-parásito.

Por otro lado, la respuesta inmune a nivel intestinal ha sido una de las áreas menos estudiadas en la amibiasis, por esta razón nos propusimos producir anticuerpos monoclonales con isotipo IgA anti-*E.histolytica* con el objeto de caracterizarlos desde el punto de vista inmunológico para posteriormente utilizarlos en estudios de protección en modelos experimentales.

Para tal fin se inmunizaron ratones Balb/c tanto por vía intragástrica como intraperitoneal con antígeno de *E. histolytica* y trofozoitos de la cepa HM1: IMSS, las dosis fueron administradas en presencia de adyuvante (muramil dipéptido y toxina colérica). Cuatro días después del último reto, se procedió a realizar la fusión utilizando células de mieloma de ratón Sp²/O-Ag14 y células linfoides de placas de Peyer, bazo y ganglios mesentéricos.

La síntesis de anticuerpos fue probada por medio de la técnica de ELISA. Una vez que los híbridos parenterales productores de inmunoglobulinas fueron identificados se procedió a probar su especificidad con distintas cepas de *E. histolytica*, *Giardia lamblia* y *Salmonella thyphimurium*. Los híbridos identificados como específicos para *E. histolytica* fueron clonados por medio de la técnica de dilución limitante. Cinco clonas fueron seleccionadas, de las cuales tres fueron productoras de inmunoglobulinas de clase IgA y dos de clase IgG. Los anticuerpos monoclonales F1P1D4 y F1P1D5 fueron seleccionados para su posterior caracterización. Valiéndose de la técnica de inmunofluorescencia indirecta se demostró que ambas clonas reconocen epitopes asociados a la membrana citoplásmica. En la inmunoelectrotransferencia encontramos que el anticuerpo monoclonal F1P1D5 parece reconocer un epítipo localizado en dos bandas proteicas de aproximadamente 30 y 60 KDa, así mismo el anticuerpo F1P1D4 reconoce un doblete de alrededor de 200 KDa. La electroforesis de la IgA producida por la clona F1P1D5 mostró un peso molecular aparente, mayor a 200 KDa lo cual sugiere que dicho anticuerpo se produce en forma dimérica.

INTRODUCCION

Las infecciones ocasionadas por *E. histolytica* representan un problema de salud pública en diversas partes del mundo, ya que este parásito tiene una distribución cosmopolita¹.

Estudios epidemiológicos indican que aproximadamente el 10% de la población mundial alberga a *E. histolytica* en el intestino, se calcula que un 10% de los individuos infectados (cerca de 48 millones) sufren de alguna forma de amibiasis. De éstos se estima que 80 a 98% presentan síntomas de disentería. Entre los individuos infectados un 20% desarrollan la forma extraintestinal, siendo la más frecuente el absceso hepático amibiano. El índice de mortalidad entre los casos con amibiasis invasora se calcula en 2 a 10%².

Se considera que la amibiasis constituye después de la malaria la segunda causa de muerte por parasitosis³.

A pesar de que existe una gran cantidad de individuos infectados por *E. histolytica* no todos desarrollan la enfermedad, el parásito habita y se reproduce libremente en el intestino sin causar daño a los tejidos. La relación entre portadores asintomáticos y pacientes con amibiasis invasora varía importantemente de una población a otra. Se considera que en México la relación es de un paciente con amibiasis invasora, por cada cuatro o cinco portadores asintomáticos⁴. Este fenómeno tiene su explicación en el hecho de que algunos individuos están infectados con organismos no virulentos o que las características del huésped no permiten el desarrollo de amibas virulentas³.

El principal reservorio de *E. histolytica* en la naturaleza es el hombre, sin embargo se ha logrado aislar el parásito de primates y de animales infectados experimentalmente. Se sabe que portadores asintomáticos pueden transmitir cepas patógenas de *E. histolytica* y los pacientes con amibiasis intestinal son la fuente más importante del agente infeccioso³.

La enfermedad ha sido observada con mayor frecuencia en grupos de población con escasos recursos económicos, baja escolaridad y saneamiento deficiente. Los factores de riesgo más importantes son el abastecimiento de agua potable inadecuado, la mala eliminación de excretas y basura, la pobre higiene de los alimentos y el hacinamiento⁵.

E. histolytica es un protozoo pequeño, dinámico y móvil gracias a una disposición citoplasmática sencilla, que adopta diferentes formas por su capacidad para emitir pseudópodos. Carece de los siguientes componentes: citoesqueleto estructurado, microtúbulos citoplásmicos, complejo de Golgi, retículo endoplásmico, mitocondrias, así como de un sistema lisosomal primario y secundario⁶. De acuerdo a la dirección en que se desplaza, posee una parte posterior que se ha denominado uroide y algunas prolongaciones citoplásmicas llamadas filopodios. Sobre su superficie suelen encontrarse un número variable de vesículas pinocíticas y vacuolas fagocíticas, lo que refleja la importante actividad endocítica de este microorganismo^{7,8}. Los trofozoitos de *E. histolytica* son anaerobios facultativos, capaces de consumir oxígeno a pesar de carecer de mitocondrias y del ciclo de los ácidos tricarbóxicos^{9,10}, transfieren electrones de sustratos reducidos a oxígenos moleculares a través de una sucesión de acarreadores que incluyen, flavinas y hierro. Pueden reproducirse en atmósferas que contienen hasta 5% de oxígeno.

Los carbohidratos son la principal fuente de energía del parásito. La glucosa es degradada a piruvato por medio de la vía glicolítica de Embden-Meyerhof; el lactato no es un producto terminal y no se han encontrado en las amibas la enzima lactato deshidrogenasa¹¹. Los principales productos terminales del metabolismo anaerobio de los carbohidratos en la *E. histolytica* son el etanol y el bióxido de carbono.

E. histolytica presenta un ciclo de vida que no se parece al de otros protozoos patógenos, carece de un estadio sexual y de un huésped intermediario¹². Bajo ciertas condiciones no bien comprendidas ocurre el enquistamiento, única forma infectante del parásito. Los individuos infectados pueden eliminar en las heces hasta 45×10^6 quistes de *E. histolytica* por día¹³. Los quistes pueden sobrevivir fuera del huésped por semanas o meses siempre y cuando se encuentren en un ambiente húmedo¹⁴.

Los síndromes clínicos que resultan de la infección por *E. histolytica* son: colitis invasora aguda o crónica y absceso hepático amibiano¹⁵.

La infección intestinal asintomática o amibiasis luminal se presenta en 90 a 99% de los individuos infectados^{16,17}. Definiéndose como portador asintomático a todo individuo

que elimine quistes de *E. histolytica* en heces y que no presente signos ni síntomas de amibiasis en cualquiera de sus formas. La amibiasis luminal es una entidad en la que la amiba vive como comensal dentro del colon¹⁸. En la mayoría de los casos el parásito se elimina espontáneamente en 12 meses¹⁹.

En la enfermedad con invasión al colon por lo regular se presentan evacuaciones con moco y sangre, dolor abdominal y con menos frecuencia fiebre^{20,21}. Siendo *E. histolytica* el agente etiológico en 2 a 14% de los niños con disenteria²². En la colitis fulminante, una de las entidades más graves, se encuentra comprometido todo el colon y con mucha frecuencia se presentan perforaciones²⁰. Otra forma de amibiasis grave es el Ameboma, éste puede confundirse con el carcinoma de colon. Estas formas severas tienen un rango de mortalidad entre 20 a 54%²³.

El absceso hepático amibiano se distingue por la presencia de fiebre, dolor en el cuadrante superior derecho²⁴ y una o más cavidades homogéneas en el hígado. Estos "abscesos" están compuestos por detritus proteicos más que por material purulento en sí. Los trofozoitos suelen encontrarse en la periferia de la lesión cavitaria²⁵. Esta entidad clínica se presenta en aproximadamente 2% de los pacientes adultos infectados con *E. histolytica*, en áreas endémicas. El absceso hepático es más frecuente en adultos que en niños^{5,26} con un predominio mayor en hombres que en mujeres (3:1)²⁷, la edad promedio en el sexo masculino se encuentra entre los 20 y 40 años de edad²⁸.

La patogénesis puede ser definida como los eventos celulares, reacciones y otros mecanismos que ocurren en el desarrollo de una enfermedad. Los trofozoitos de *E. histolytica* aparentemente causan enfermedad invasora por: Adherencia a la mucosa del colon, dando como resultado la colonización intestinal; ruptura de la barrera intestinal por la secreción de enzimas proteolíticas o toxinas; lesión de células epiteliales e inflamatorias del huésped, formación de úlceras en el colon y tejidos profundos y/o invasión a órganos distantes como el hígado^{29,30,31}. A través de estudios *in vitro*, se ha sugerido la posible existencia de mecanismos de evasión inmune en este protozoario, ya que los anticuerpos antiamebianos de diferentes especies unidos a la superficie de los trofozoitos, inducen la redistribución de antígenos de la

membrana formando un casquete ("caps") los cuales pueden ser internalizados o eliminados por el protozooario hacia el medio sin pérdida de su viabilidad, este fenómeno no ha sido observado en estudios *in vivo*³².

El estudio de la biología de este parásito, así como su relación con el huésped natural, el hombre, y los estudios en los modelos experimentales disponibles han dado lugar a importantes avances en el conocimiento de este protozooario. En gran parte esto se ha logrado gracias a la posibilidad de cultivar trofozoitos de diferentes especies y cepas de amibas en forma axénica³³. Por otro lado, uno de los aspectos interesantes en la relación huésped-parásito en la amibiasis son los mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*, algunos de los cuales se han podido mimetizar en sistemas experimentales tanto *in vivo* como *in vitro* tales como la producción de absceso hepático amibiano en el modelo del hámster³⁴, la aglutinación en presencia de concanavalina A (Con A)³⁵ y el efecto citopático sobre células epiteliales *in vitro*³⁶, siendo este último efecto dependiente de adherencia, es decir, el contacto trofozoito-célula blanco es requisito indispensable para producir lisis y fagocitosis. Estos son algunos de los parámetros experimentales que se han relacionado con la virulencia del parásito.

Los factores de adhesividad en los microorganismos patógenos son de gran importancia para el proceso de colonización e invasión de los tejidos³⁷. Esto ha sido demostrado en el caso de *E. histolytica* en experimentos donde, el bloqueo de la adherencia a las células blanco, es capaz de inhibir el efecto citopático^{38,39}. Así mismo, se han encontrado algunas actividades de lectina en trofozoitos y en extractos de éstos, una de las lectinas mejor estudiadas es la que puede ser inhibida por N-acetil galactosamina⁴⁰ y otras que pueden ser inhibidas por oligómeros de N-acetil glucosamina⁴¹. Estas moléculas participan en el mecanismo de adhesión de los trofozoitos a células blanco.

Otro interesante marcador asociado a la patogenicidad amibiana son los zimodemos, éstos son los patrones electroforéticos de ciertas isoenzimas presentes en lisados acuosos de amibas, los cuales se utilizaron primero para distinguir a *E. histolytica* de otras especies amibianas⁴², la tipificación de tales zimodemos es actualmente el método más conocido y utilizado para distinguir entre cepas patógenas y no patógenas del parásito.

Así tenemos que mediante el examen electroforético de cuatro isoenzimas (glucosafosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, L-malato: NADP⁺ óxido reductasa y hexoquinasa), involucradas en el catabolismo de carbohidratos de una población amibiana, se han podido identificar un total de 24 zimodemos diferentes. Las cepas obtenidas de pacientes con amibiasis invasora se agruparon en diez patrones isoenzimáticos diferentes (II, II α , VI, VII, XI-XIV, XIX, XX) el resto de los zimodemos agrupan a las amibas aisladas de portadores asintomáticos^{43,44,45,46}.

Existen otras técnicas mas recientes que permiten distinguir entre cepas patógenas y no patógenas, una de ellas es la presencia de una proteinasa extracelular de cisteína de 56 KDa, la cual produce invasión tisular al degradar la colágena y la laminina^{47,48,49}, así como la activación del complemento por ruptura de C3. Por otro lado se han descrito sondas de ADN específicas de zimodemos patógenos y no patógenos⁵⁰.

Las personas infectadas con *E.histolytica* pueden albergar al parásito durante un tiempo indefinido sin presentar ningún tipo de sintomatología, aunque en cualquier momento durante la infección el parásito puede invadir los tejidos del huésped. En el intestino las lesiones pueden ir desde una inflamación difusa y daño visible unicamente por microscopía, a formas severas en las que se presentan diferentes grados de ulceración, siendo la forma superficial o en "botón de camisa" la clásica lesión de la amibiasis intestinal⁵¹, la erosión puede ir de la mucosa a la submucosa y finalmente producir perforación de la pared intestinal, durante la invasión a la submucosa los trofozoitos pueden migrar a sitios fuera del intestino, siendo el órgano más comunmente afectado el hígado^{25,52}.

Durante mucho tiempo se pensó que las amibas secretaban enzimas hidrolíticas las cuales eran las directamente responsables de la destrucción tisular, sin embargo, Tsutsumi V. y Martínez-Palomo A. (1984, 1988) estudiaron la secuencia de eventos morfológicos que se presentan en el absceso hepático amibiano producido en hamsters en forma experimental, encontrando que los trofozoitos no son los responsables directos del daño producido a los hepatocitos, la destrucción del tejido parece ser el resultado de la acumulación y subsecuente lisis de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) y macrófagos alrededor de las amibas, con la

consecuente liberación de enzimas lisosomales^{53,54}.

Posteriormente Becker y colaboradores (1988) inyectaron 1×10^6 trofozoitos de *E.histolytica* cultivados axénicamente en el tejido subcutáneo de ratas Wistar normales o leucopénicas, encontrando que en ambas se presenta un proceso de necrosis y hemorragia del tejido en fases tempranas y más tarde existe una extensa destrucción del tejido hepático, llegando a la conclusión que en este modelo experimental los LPMN no son requeridos para la producción de la necrosis de los tejidos⁵⁵. Pérez-Tamayo y colaboradores (1991) produjeron un grupo de hamsters hipocomplementémicos los cuales fueron inoculados por vía portal con 1×10^6 trofozoitos de *E.histolytica* cultivados axénicamente, posteriormente se sacrificaron a las 3, 6, 10 y 24 hrs, encontrando que durante las primeras 10 hrs las amibas se encuentran libres en los sinusoides y en contacto con los hepatocitos, no existen LPMN y no se presenta necrosis hepática. Es hasta después de las 10 hrs cuando las células mononucleares inician su aparición en la vecindad de las amibas, estas células sucumben y es entonces cuando se detecta la necrosis en el parénquima hepático, localizándose únicamente en la vecindad de las células mononucleares destruidas.

Dichos resultados sugieren que la presencia de LPMN en la fase inicial del absceso hepático amibiano está mediada por el complemento, condición que al parecer no es necesaria en el caso de las células mononucleares, y que la necrosis de los hepatocitos es originada por la destrucción de las células inflamatorias y no por las amibas⁵⁶.

Hablar de un cuadro característico de lesiones producidas por *E.histolytica*, es hablar de una zona extensa de necrosis tisular por coagulación y/o licuefacción de amibas viables pero con pocas áreas de infiltrado celular inflamatorio. El material necrótico aparece como un reemplazo de la estructura tisular con un granulado fino eosinófilo o un material extracelular basófilo con escasos restos nucleares y frecuentemente trofozoitos amibianos fácilmente detectables^{57,58,59}.

Dos han sido los mecanismos considerados responsables de la producción de necrosis tisular por parte de *E.histolytica*, siendo uno de ellos la capacidad para atraer y destruir LPMN y la liberación de sus productos tóxicos sobre componentes tisulares⁶⁰.

Así tenemos que después de que las amibas han reconocido algunos tejidos éstas activan un poderoso efecto quimiotáctico sobre LPMN, inmediatamente después, los leucocitos endógenos mueren al establecer contacto con trofozoitos virulentos, debido posiblemente a la acción del ameboporo, fosoflipasa A y quizá algún otro mecanismo citopático de las amibas; de esta forma los leucocitos muertos se desintegran y liberan todas sus potentes enzimas hidrolíticas, las cuales llegan a ser el mecanismo responsable de la muerte celular parenquimatosa y de la demolición de sustancias intercelulares^{61,62,63}.

Varios grupos han estudiado la respuesta inflamatoria en la amibiasis en su fase inicial, algunos de estos estudios se han realizado directamente con material obtenido de autopsias, llegando a la conclusión que la inflamación es un proceso que se presenta en forma moderada o no se encuentra en las lesiones amibianas que están libres de bacterias patógenas, y el grado de inflamación no se correlaciona con el proceso necrótico^{25,52,64,65}. Este deterioro de la reacción inflamatoria se ha hecho evidente a través de algunos experimentos, los cuales demuestran la inhibición de la quimiotaxis de monocitos por *E.histolytica* y una actividad fagocítica disminuida de los LPMN periféricos en pacientes con amibiasis^{66,67}.

La inhibición de la quimiotaxis de monocitos por *E.histolytica* parece ser responsabilidad de un factor encontrado en el medio de cultivo axénico tanto de amibas patógenas (virulentas y no virulentas) como de no patógenas⁶⁸. El sobrenadante de estos cultivos es capaz de inhibir fenómenos tan importantes en la respuesta inflamatoria como la quimiotaxis y quimiocinesis de monocitos humanos, pero no para LPMN.

Dada la importancia de los antígenos amibianos tanto en la respuesta inmune por parte del huésped infectado como para tratar de establecer un método diagnóstico y seroepidemiológico, ha sido de gran utilidad el contar con trofozoitos de *E.histolytica* cultivados en medio axénico⁶⁹, lo que ha permitido la obtención de antígeno amibiano a partir de células completas, de homogenados, de productos secretados, de material particulado o en solución, de ahí que se hayan producido antígenos de superficie, citoplasmáticos y exoantígenos.

El interés por los antígenos de la membrana celular de *E.histolytica* se basa en el

hecho de que éstos son el primer contacto directo del parásito con el sistema inmune del huésped durante la infección amibiana⁷⁰.

El estudio de los antígenos proteicos de superficie se ha realizado a partir de extractos acuosos totales obtenidos por sonicación^{71,72,73} o por productos de la homogenización de las amibas^{74,75} dando como resultado un complejo de antígenos de *E.histolytica* muy heterogéneo dependiendo de las diferentes cepas amibianas utilizadas en su preparación, así como la utilización o no de inhibidores de proteasas. Las diferencias en la preparación de antígenos amibianos para su utilización en pruebas diagnósticas y en estudios seroepidemiológicos es una fuente de variabilidad en los resultados de la evaluación de tales pruebas.

Así tenemos que Krupp (1977) afirma que el esqueleto antigénico de las cepas HK9 y NIH-200 de *E.histolytica* contiene 14 proteínas⁷⁶, mientras que Chang y colaboradores (1979) identificaron 32 y 20 antígenos en las cepas HT-31 y HK-9 respectivamente⁷⁷.

Por otro lado, en repetidas ocasiones extractos acuosos de amibas han sido sometidos a fraccionamiento cromatográfico por filtración en gel^{72,73,74,75,78}, encontrando que el perfil de elución por lo regular resulta en 3 y 5 fracciones constituidas en su mayoría por glicoproteínas. La fracción I, una glicoproteína de 650,000 daltones resultó ser la más antigénica, seguida por las fracciones II y III, no siendo así en el caso de las fracciones IV y V⁷⁹.

También han sido reconocidas las proteínas de superficie responsables de la adhesión *in vitro* de trofozoitos de *E.histolytica* a eritrocitos humanos, células epiteliales (MDCK) y células de ovario de hamster (CHO)^{80,81,82,83,84,85}.

Para la detección de dichas proteínas se han utilizado diferentes métodos, identificándose una proteína de 112 KDa^{80,82}, de 170 KDa⁸¹ y una de 220 KDa^{84,86}.

En cuanto a la presencia o no de carbohidratos en los antígenos de superficie, Isibasi y colaboradores (1982) valiéndose del método de fenol-agua, obtuvieron un complejo antigénico polisacárido proveniente de trofozoitos de *E.histolytica* HK-9 el cual está constituido por 85% de azúcares, 8% de aminoácidos y sólo el 2.5% por lípidos. A dicho

compuesto se le asignó el nombre de lipopeptidofosfoglicana (LPPG) el cual es reconocido por sueros de pacientes con absceso hepático amibiano así como por sueros de animales inmunizados con este antígeno^{87,88}. Así mismo mediante la inoculación intracecal de LPPG se ha logrado inducir la síntesis de IgA secretora⁸⁹.

En cuanto a los lípidos, éstos son en general inmunógenos pobres y tan solo Gitler y colaboradores (1984) han identificado un lípido altamente inmunogénico en *E.histolytica*⁹⁰.

Los antígenos citoplasmáticos se originan de las fracciones lisosomales y ribosomales de *E.histolytica*^{91,92} y probablemente sean más abundantes e inmunogénicos que los antígenos superficiales⁹³ tal y como ocurre en *E.invadens*, tricomonas, leishmanias y bacterias^{94,95}.

De esta forma, el principal estímulo para la producción de anticuerpos sería el de los antígenos citoplasmáticos expuestos por amibas destruidas, mas que por trofozoitos intactos⁹³.

Por otro lado, se han identificado antígenos en el medio de cultivo de *E.histolytica*, así se habla de una citotoxina la cual puede ser inhibida por suero inmune, ó por algunos factores presente en suero normal⁹⁶, una quinasa de adenosina⁹⁷ y una β -N-acetilglucosaminidasa⁹⁸.

E.histolytica es un parásito con la capacidad para inducir tanto una respuesta de tipo celular como humoral⁹⁹. No existe duda de la participación de la respuesta inmune celular en la amibiasis a nivel sistémico¹⁰⁰.

Una de las pruebas más evidentes de la respuesta inmune celular en la amibiasis invasora, es sin duda la prueba cutánea para determinar hipersensibilidad de tipo tardío. Se puede decir que todos los pacientes que se recuperan de un cuadro de absceso hepático amibiano, presentan un estado de hipersensibilidad retardada cutánea a antígenos amibianos al contrario de lo que sucede en pacientes que se encuentran en estadios tempranos de la enfermedad, aparentemente debido a un estado de anergia transitoria¹⁰¹.

Este período en el que se presenta un estado de inmunosupresión específica en

las etapas iniciales del absceso hepático amibiano no tratado, ha sido demostrado en pruebas de citotoxicidad de linfocitos provenientes de pacientes así como por la disminución de la producción del factor inhibidor de la migración de macrófagos *in vitro*¹⁰².

Por otro lado, se ha informado que los linfocitos aislados de sangre periférica de pacientes con absceso hepático amibiano responden a la estimulación antígeno-específica en pruebas de transformación blastoide de dichas células¹⁰³, fenómeno que no se presenta en individuos sanos ni en pacientes con amibiasis intestinal, siendo una posible explicación el grado de invasión tisular y/o de la inmunosupresión de la rama aferente de la respuesta inmune¹⁵. Por otro lado, algunos productos de *E.histolytica* parecen tener actividad mitogénica, los cuales son responsables de la expansión policlonal observada en individuos con absceso hepático amibiano¹⁰⁴; otras investigaciones señalan la inversión de la relación de células T ayudadoras/células T supresoras en estos mismos pacientes¹⁰⁵.

El papel que desempeñan los macrófagos en la amibiasis como mecanismo de defensa, constituye en términos generales una forma de resistencia natural del huésped¹⁰⁶.

En estudios realizados en hamsters se ha comprobado que el mecanismo de defensa contra la infección amibiana puede verse favorecido al tratar a los macrófagos con bacilo de Calmette -Guérin (BCG) o deprimido sin ser tratados con sílice^{107,108}, lo cual además de disminuir la función del macrófago propicia un aumento en la multiplicación de *E.histolytica* a nivel intestinal¹⁰⁶.

La interacción de los macrófagos con trofozoitos de *E.histolytica* da lugar a la destrucción de los macrófagos sin que se altere la viabilidad de las amibas. Un fenómeno contrario se presenta al interaccionar los trofozoitos con macrófagos activados a través de linfocinas, en donde la destrucción está a cargo de dichos macrófagos, encontrándose hasta un 55% de muerte de trofozoitos, sin embargo un porcentaje considerable de macrófagos mueren, atribuyendo dicho fenómeno a un efecto indirecto de las amibas más que a un mecanismo dependiente de contacto¹⁰⁹, este fenómeno no se altera al añadir suero inmune¹⁵.

De esta forma podemos decir que el efecto citotóxico ejercido sobre amibas virulentas por macrófagos activados es un mecanismo dependiente de contacto, independiente

de anticuerpos y que involucra un proceso tanto oxidativo como no oxidativo¹⁰⁹.

En cuanto a la respuesta inmune humoral, tradicionalmente se ha considerado que la aparición de anticuerpos antiambianos circulantes, son el resultado de un proceso de invasión tisular por parte de *E.histolytica* en el intestino¹¹⁰, condición que no es exclusiva de la amibiasis en su forma sintomática, ya que también se han encontrado dichos anticuerpos en portadores asintomáticos, en donde un proceso invasor anterior o una invasión parasitaria subclínica pudieran ser la explicación^{99,110}. Se ha reportado en portadores asintomáticos una frecuencia mayor al 78% de sueros con anticuerpos anti-amibianos¹¹¹.

En realidad no es claro el papel que desempeñan los anticuerpos que se generan en el huésped en contra de *E.histolytica*; se ignora si tienen un efecto protector o si sólo son el resultado de la invasión tisular¹¹² ya que títulos altos de anticuerpos coexisten durante la fase aguda de la enfermedad y persisten durante largo tiempo. A pesar de ello la reinfección por este protozoario es frecuente^{113,114}.

Alrededor de una semana posterior a la aparición de los primeros síntomas en humanos y en animales de experimentación se detectan inmunoglobulinas circulantes específicas de clase IgG^{115,116} al parecer subclase IgG₂¹¹⁷, los anticuerpos IgM, IgA e IgE también se han encontrado elevados aunque en menor cantidad^{118,119,120}.

Se ha reportado que la lámina propia del aparato gastrointestinal contiene de 20 a 30 células productoras de IgA por cada célula productora de IgG, la relación se invierte en ganglios linfáticos y bazo, siendo ésta de 1:5¹²¹.

Diferentes estudios han demostrado la presencia de coproanticuerpos en amibiasis intestinal^{122,123,124} siendo positivos en un 80% de los pacientes¹²⁴, en donde la inmunoglobulina predominante es la IgA secretora y en menor cantidad IgM e IgG¹²⁵.

La IgA secretora anti-*E.histolytica* ha sido reportada en la bilis de ratas inmunizadas intracecalmente¹²⁶, en la leche humana¹²⁷ y en calostro¹²⁸, los anticuerpos IgA e IgM se han encontrado en secreciones de íleon y colon así como en las heces de pacientes con absceso hepático amibiano¹²⁹.

La presencia de anticuerpos de clase IgM sugiere que esta inmunoglobulina

puede ser importante en los mecanismos de defensa contra *E.histolytica*, en virtud de su capacidad para activar el sistema de complemento¹²⁹.

Ximénez y colaboradores (1990) reportaron la presencia de coproanticuerpos anti-*E.histolytica* tanto en pacientes con amibiasis intestinal como en el grupo control estudiado. En ambos grupos los títulos mas altos correspondieron a los anticuerpos de la clase IgA, seguidos por los de la clase IgM e IgG. Los resultados demostraron que los títulos de coproanticuerpos de los diferentes isotipos no permiten distinguir entre individuos adultos con amibiasis intestinal aguda y la población normal en zonas donde la amibiasis se comporta como una enfermedad endémica¹³⁰.

Este mismo grupo, en un estudio reciente encontró que al inmunizar ratones BALB/c con trofozoitos de *E.histolytica* HM1:IMSS por vía oral, sistémica o combinando ambas vías de inmunización, es posible inducir anticuerpos específicos tanto en el suero como a nivel local; existiendo una correlación entre las inmunoglobulinas presentes en intestino y la vía de inmunización utilizada. De esta forma la IgA a nivel local es favorecida por la administración de trofozoitos por vía oral, mientras que la inmunización sistémica favorece la producción de IgG. Aunque ambas vías son efectivas en la inducción de IgA en el intestino, los niveles mas altos de estas inmunoglobulinas aparecen en los ratones inmunizados oralmente¹³¹.

En las mucosas se desarrollan mecanismos inmunes y no inmunes capaces de prevenir la invasión o daño tisular por agentes patógenos y toxinas¹³², uno de los más importantes es la presencia de IgA la cual funciona como una barrera contra la penetración y colonización de la mucosa intestinal por microorganismos patógenos y como inhibitoria de la absorción de antígenos a nivel intestinal¹³³.

Así tenemos que la presencia de anticuerpos IgA secretores en diferentes modelos de infección por virus, bacterias y parásitos se correlaciona mejor con el fenómeno de resistencia dado por los anticuerpos locales, que con la presencia de anticuerpos circulantes^{134,135}.

La IgA secretora es capaz de inhibir la adherencia a células epiteliales a través del reconocimiento de antígenos presentes en la superficie microbiana¹³⁵.

El hecho de que exista una producción de anticuerpos circulantes en la amibiasis invasora en forma regular, podría contribuir a la generación de complejos solubles, los cuales parecen estar involucrados en la patogénesis de la enfermedad¹⁵. Sin embargo, no han sido reportadas alteraciones propias de enfermedad por complejos inmunes en procesos amibianos^{136,137}. Existen datos que apoyan la presencia de complejos inmunes circulantes en pacientes con absceso hepático amibiano y portadores asintomáticos¹³⁸.

El fenómeno de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) no ha sido probado del todo en la amibiasis¹³⁹. Se han detectado receptores específicos para la región Fc de IgA en macrófagos, linfocitos y neutrófilos¹⁴⁰, es posible que este receptor promueva la CCDA con anticuerpos de la clase IgA; así este mecanismo podría jugar un papel importante en la protección contra la amibiasis.

Por otro lado en la infección experimental por *Taenia taeniformis*, la transferencia pasiva de IgA específica parece tener un efecto protector contra la infección^{141,142}.

Teniendo en cuenta que la amibiasis es una enfermedad adquirida primordialmente por la vía oral y su órgano blanco es la mucosa intestinal del colon, es razonable pensar que así como en los ejemplos anteriormente mencionados, la IgA secretora anti-amibiana pudiera tener un papel importante en el fenómeno de protección durante las etapas tempranas de la relación huésped-parásito; es posible que esta inmunoglobulina pudiera ser la responsable del balance que existe entre el gran número de individuos infectados (amibiasis luminal) y el número de individuos con amibiasis sintomática (amibiasis invasora) que se observa en algunas zonas endémicas¹⁴³.

Ya que la respuesta inmune a nivel intestinal ha sido una de las áreas menos estudiadas en la amibiasis, nos hemos propuesto producir anticuerpos monoclonales de isotipo IgA anti-*E.histolytica* con el objeto de caracterizarlos desde el punto de vista inmunológico para posteriormente utilizarlos en estudios de protección en modelos experimentales.

En el presente trabajo se describen las técnicas utilizadas para la producción de anticuerpos monoclonales IgA anti-*E.histolytica* y su caracterización inmunológica.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratones singénicos de la cepa Balb/c, hembras de seis a ocho semanas de edad, alimentados con tabletas de Purina (Purina de México S.A.) y agua estéril.

TROFOZOITOS

Se usaron trofozoitos cultivados en condiciones axénicas, medio Ty1-S-33 en fase de crecimiento logarítmico³³. Las cepas de *E.histolytica* utilizadas fueron: HM1:IMSS, HK9, y Laredo, la cual se encuentra clasificada dentro de las denominadas entamoebas semejantes a *E.histolytica*, las especies *E.invadens*, trofozoitos de *Giardia lamblia* y *Salmonella thyphimurium*.

LINEA CELULAR DE MIELOMA MURINO

Se utilizaron células Sp²/0-Ag14 de mieloma de ratón sensibles a hipoxantina, aminopterina y timidina. Dichas células se mantuvieron en medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (D-MEM) (Gibco laboratories, Inc. Grand Island, N.Y. USA) adicionado con: 10% de suero fetal bovino (Hyclone laboratories Inc. Logan, Utha USA) inactivado a 56°C durante 30 min; L-glutamina 2 mM (Gibco Laboratories Inc. Grand Island N.Y. USA) piruvato de sodio 1 mM (Gibco Laboratories Inc. Grand Island N.Y. USA) 1% de aminoácidos no esenciales (sol. 100 x Gibco Laboratories, Inc. Grand Island N.Y. USA) 0.5% de aminoácidos esenciales (Sol. 100 x Gibco Laboratories, Inc. Grand Island, N.Y. USA), 1% de la solución de antibióticos-antimicóticos (Sol. 100 x Gibco Laboratories, Inc. Grand Island NY. USA).

INMUNIZACION

Las inmunizaciones se realizaron en dos grupos de ratones. En el primer grupo los animales fueron inoculados intragástricamente (IG) con 500 µg de antígeno de extracto de membrana de *E.histolytica* resuspendido en una solución de bicarbonato de sodio balanceada 0.01M pH 7.4 y 100 µl de Muramil dipéptido (MDP), (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA) los ratones recibieron 3 dosis en días consecutivos, repitiendo el procedimiento a los 15 días. Posteriormente los ratones se inocularon intraperitonealmente (IP) con 100 µg del antígeno en los días 30 y 45.

Un segundo grupo de animales fueron inmunizados IP con 2.5×10^6 trofozoitos de *E. histolytica* en fase de crecimiento exponencial, suspendidos en solución de fosfato de potasio 19 mM más NaCl 0.27 M, pH 7.2 (PD). El antígeno fué administrado en 2 ocasiones con 15 días de intervalo entre cada una; 45 días después los ratones se retaron IG con 5×10^6 trofozoitos y 20 μ g de toxina colérica (TC). (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO. USA)

OBTENCION DEL ANTIGENO

El antígeno se obtuvo a partir de trofozoitos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS cultivados en medio axénico TY1-S-33 descrito por Diamond (1978). Se cosecharon 8×10^6 trofozoitos en fase logarítmica de crecimiento en baño de hielo y se lavaron tres veces con PD a 200 g, 10 min y a 4°C (Beckman modelo TS-6). Se decantaron los sobrenadantes y los botones se colectaron en un tubo único, a este paquete se le agregaron los siguientes inhibidores de proteasas: 50 μ l de Fenil-metilsulfonil-fluoruro (PMSF) 50 mM y 40 μ l de para-hidroximercuribenzoato (PHMB) 10 mM (Sigma, Chemical Co., St. Louis, Mo. USA).

A continuación 10^8 trofozoitos se resuspendieron en 5 ml de Tris-HCl 10mM, pH 7.5 y por medio de un homogenizador manual sumergido en baño de hielo se homogenizó la suspensión. El homogenizado se centrifugó a 8000 g durante 30 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada (Sorval, modelo RC-5B, Du Pont Instruments Boston MA., USA, rotor modelo SS-34), el sobrenadante se almacenó en alicuotas de 0.5 ml a -20°C previa determinación de proteínas por el método de Lowry¹⁴⁴, a esta fracción se le denominó antígeno soluble. Así mismo la fracción restante denominada antígeno insoluble se suspendió en una solución de Tris-HCL 10mM, pH 7.5, se le determinó la concentración proteica y se le agregaron los inhibidores de proteasas almacenándose en alicuotas de 0.5ml a -20°C

OBTENCION DE FLUIDO INTESTINAL

Se obtuvo el fluido intestinal de los ratones inmunizados y los controles por medio de la técnica descrita por Elson, O. y colaboradores¹⁴⁵, con el fin de determinar la presencia de anticuerpos antiambianos.

Cada ratón fué colocado sobre una malla de alambre dentro de un vaso de precipitado, el cual contenía 3 ml de una solución compuesta por inhibidor de tripsina de soya

0.1 mg/ml en EDTA 50mM.(Sigma, Chemical Co., St. Louis MO. USA)

Posteriormente se les administró a cada uno de los ratones cuatro dosis de 0.5 ml de una solución de lavado, a intervalos de 15 minutos, vía intragástrica. Dicha solución estaba compuesta por NaCl 25 mM, Na₂SO₄ 40 mM, KCl 10mM, NaHCO₃ 20 mM (Merck de México, S.A.) y polietilenglicol 3350 (Gibco Laboratories, Inc. Grand Island,N.Y. USA) 48.5 mM. Treinta minutos después de la última dosis de la solución de lavado se les administró 0.1 mg de pilocarpina vía intraperitoneal (IP), la descarga del contenido intestinal ocurrió dentro de los 30 min posteriores a la administración de pilocarpina, todo el material obtenido se transfirió a un tubo de 15 ml (Costar, Cambridge MA. USA) llevándolo hasta 6 ml con PBS.

A continuación, los viales con las muestras se agitaron vigorosamente en un vortex y se centrifugaron 10 min a 650 g. Por cada 3 ml del sobrenadante obtenido se agregaron 30 µl de PMSF (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.USA) 100 mM en etanol al 95% y se centrifugó a 27000 g durante 20 min a 4°C. Nuevamente, por cada 2 ml de sobrenadante de la muestra recién centrifugada se agregaron 20 µl de PMSF 100 mM en etanol al 95% y 20 µg de azida de Sodio (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA) al 1%.

Las muestras fueron almacenadas a -20°C, después de añadirles suero fetal bovino (Cell Culture Laboratories, Cleveland, Ohio USA).

DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-*E. histolytica* POR EL METODO INMUNOENZIMATICO (ELISA)

La detección de anticuerpos anti-*E. histolytica* se realizó en las muestras del suero, fluido intestinal, en el sobrenadante de cultivo de los híbridos obtenidos así como en el líquido de ascitis producido por los ratones inoculados con cada una de las clonas resultantes. La detección de dichos anticuerpos se realizó utilizando el método de ELISA de acuerdo a como lo describe Ortiz-Ortiz y colaboradores¹⁴⁶.

Para la realización de esta técnica se emplearon tiras con 12 pozos removibles para microtitulación (Immunolon II, Dynatech Laboratories Inc. Alexandria VA. USA) las cuales se fijaron con 10³ trofozoitos por pozo suspendidos en solución amortiguadora de carbonatos 0.01M pH 9.6, colocando 50 µl por pozo de esta suspensión. Se secaron al vacío

por espacio de aproximadamente 12 hrs a temperatura ambiente. En el momento de su utilización los pozos se hidrataron con una solución de fosfatos (PBS) 0.02M pH 7.2 a la que se le añadió 0.5% de tween 20 y 0.5% de albúmina sérica bovina (PBS-BSA-TWEEN), así mismo se lavaron en dos ocasiones durante 3 min cada una con PBS-TWEEN,¹⁴⁷ este procedimiento de lavado se utilizó durante todo el ensayo.

Posteriormente los pozos se bloquearon con albúmina sérica bovina al 3% (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA) incubando toda la noche a 4°C. A continuación y previo lavado de los pozos, se adicionaron 50 µl de la muestra y se incubaron durante una hora en agitación suave y a temperatura ambiente, los pozos se lavaron y se añadieron a cada pozo 50 µg del anticuerpo anti-ratón (anti IgG, IgM ó IgA) peroxidado (Cappel, Pa., USA) a una dilución de 1:1000 en PBS para incubar nuevamente durante 60 minutos. Por último se añadieron 50 µl de sustrato (10 ml de solución amortiguadoras de citratos 0.1M, pH 4.5, adicionada de 10 mg de 0-Fenilendiamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA) y 4 µl de H₂O₂ al 30% (Merck de México, S.A.). La reacción se dejó transcurrir hasta observar la aparición de color (aproximadamente 15 min.), se bloqueó la reacción añadiendo 200 µl de H₂SO₄ 1 M (Merk de México, S.A.) por pozo y las tiras se leyeron en un analizador de ELISA a una longitud de onda de 490 nm (Biokinetics Reader-Biotek instruments).

OBTENCION DE CELULAS DE BAZO

Se obtuvieron células de bazo de ratones Balb/c inmunes seleccionados para la fusión, para ello los ratones se anestesiaron con éter y se sacrificaron por dislocación cervical, posteriormente se sumergió a cada uno en alcohol y se procedió a diseccionar la piel del abdomen, a continuación se realizó una incisión vertical a lo largo del peritoneo, se localizó el bazo, se extrajo y se colocó en una caja de Petri con aproximadamente 10 ml de RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Inc. Grand Island N.Y. USA) adicionado con 1% de solución de antibióticos-antimicóticos (Sol 100 X Gibco), con esta misma solución se infiltró el bazo y finalmente se disgregó con pinzas de disección. Esta suspensión celular se transfirió a un tubo cónico de 50 ml (Costar, Cambridge MA. USA.) y se incubó en baño de hielo por 10 min., el sobrenadante se transfirió a otro tubo cónico y se centrifugó a 200 g por 10 min a 4°C. El botón celular se

resuspendió en RPMI-1640, se determinó el porcentaje de viabilidad por medio del método de exclusión con azul tripano y se procedió a contarlos y ajustarlos a una concentración de 10^7 células/ml para proceder a la hibridización.

OBTENCION DE CELULAS LINFOIDES DE LAS PLACAS DE PEYER

Las placas de Peyer se obtuvieron de ratones Balb/c inmunes. Para su obtención se procedió a disecar el intestino delgado de cada uno de los ratones seleccionados, iniciando por la porción pilórico-duodenal, se identificaron las placas de Peyer y se fijaron con pinzas de Allis en forma tal que pudieran ser resecadas con tijeras curvas, tratando de no llegar a la luz intestinal, evitando así una posible contaminación con materia fecal.

A continuación las placas de Peyer se depositaron en una caja de Petri con aproximadamente 5 ml de RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Inc. Island, N.Y. USA) adicionado con 1% de la solución de antibióticos antimicóticos (Sol. 100x Gibco), las placas se lavaron en cinco ocasiones aproximadamente, cambiando en cada ocasión la caja de Petri la cual contenía medio fresco.

Las células linfoides se obtuvieron disgregando las placas de Peyer con dos agujas hipodérmicas estériles. La suspensión celular se transfirió a un tubo de plástico cónico de 50 ml (Costar, Cambridge, MA. USA) y se incubó en baño de hielo por 10 min, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo cónico para centrifugarlo a 200 g por 10 min a 4°C (Beckman modelo TJ-6). El botón celular se resuspendió en RPMI-1640 para la hibridización, después de determinar su viabilidad como se describió anteriormente las células se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células/ml.

OBTENCION DE CELULAS DE EXUDADO PERITONEAL

Se utilizaron ratones Balb/c entre 6 a 8 semanas de edad, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se sumergieron en alcohol para proceder a disecar piel, en seguida se le administraron 5 ml de sacarosa estéril 0.34 M a 4°C via intraperitoneal. Después de darles masaje abdominal, se procedió a coleccionar el exudado peritoneal en tubos cónicos de plástico (Costar Cambridge, MA. USA) las cuales se centrifugaron a 200 g durante 10 min a 4°C. El paquete celular se resuspendió en D-MEM completo (Gibco laboratories, Inc. Grand

Island N.Y. USA), se centrifugó una vez más como en el paso anterior y se procedió a ajustar la suspensión a 5×10^4 células/ml. Finalmente las células se distribuyeron en placas para microtitulación con 96 pozos a razón de 100 μ l de la suspensión celular/pozo. Se incubaron toda la noche en estufa para cultivo de células a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

PRODUCCION DE HIBRIDOMAS

Las células de mieloma Sp²/0-Ag14 en fase de crecimiento exponencial se cosecharon y centrifugaron a 200 g durante 10 min a temperatura ambiente, se resuspendieron en RPMI-1640 sin suero y se procedió a contarlas y determinar su viabilidad en una cámara de Neubauer por medio de la técnica de exclusión con azul tripano. Las células de bazo de ratón Balb/c inmune, los ganglios mesentéricos y las placas de Peyer fueron centrifugadas y suspendidas en RPMI-1640. Posteriormente se mezclaron las células de mieloma con las células linfoides manteniendo una relación 1:5 respectivamente, todo se llevó a cabo en 6 tubos de fondo cónico de 15 ml (Costar, Cambridge MA. USA)¹⁴⁸). A continuación se centrifugaron los tubos a 200 g durante 5 min a temperatura ambiente, una vez retirado el sobrenadante de cada tubo se procedió a realizar la fusión añadiendo a cada uno de los tubos 0.5 ml de polietilenglicol 4000 al 50% en RPMI-1640(Gibco Laboratories, Inc. Grand Island N.Y. USA.) a 37°C, se agitaron durante 90 seg para posteriormente añadir cada 90 seg 0.5ml, 1ml, 2ml y 4ml de RPMI-1640 agitando después de cada volumen añadido. A continuación las células se centrifugaron (200g, 5 min. a temperatura ambiente), el botón se resuspendió en medio de cultivo, se incubaron durante 2 hrs a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ agitándolas cada 15 min. Posteriormente las células se centrifugaron (200g, 10 min. a temperatura ambiente) y se suspendieron en medio selectivo, D-MEM-completo adicionado de: hipoxantina 10^{-2} M, aminopterina 4×10^{-5} M y timidina 1.6×10^{-3} M(D-MEM-HAT) y 1% de la solución de antibióticos-antimicótico (sol. 100 x Gibco Laboratories, Inc. Grand Island N.Y. USA).

La suspensión celular obtenida se diluyó 1:5 y se distribuyó en placas para microcultivo de 96 pozos (Costar, Cambridge MA. USA) a una densidad de 2×10^6 células/ml, dichas placas habían sido previamente incubadas, durante 24 hrs con células de cavidad peritoneal de ratones Balb/c.

CRECIMIENTO DE HIBRIDOS.

La observación de las placas de cultivo se efectuó diariamente realizando el primer cambio de medio de cultivo a los 5 días después de la fusión, para ello se tomaron 100 μ l del sobrenadante reemplazándolos con medio fresco de D-MEM-HAT durante 3 días consecutivos, esto con la finalidad de eliminar los anticuerpos que pudieran haberse producido por los plasmocitos no fusionados. Posteriormente se realizó la detección de anticuerpos anti-amiba en el sobrenadante de cada uno de los pozos donde el crecimiento de colonias fuera evidente, para ello se utilizó el método de ELISA. Los pozos donde los resultados fueron positivos se transfirieron a placas de cultivo con 24 pozos (Costar, Cambridge MA. USA) previamente recubiertas con macrófagos peritoneales.

CLONACION DE HIBRIDOS POR DILUCION LIMITANTE

La clonación de los híbridos se realizó en cajas con 96 pozos (Costar, Cambridge MA. USA) las cuales fueron incubadas con células peritoneales de ratón, 24 hrs previas a la clonación, a 37°C y 5% de CO₂.

Los híbridos seleccionados y extraídos de cajas con 24 pozos fueron suspendidos en la cantidad necesaria de D-MEM completo que permitiera tener una concentración de 10 y 5 células/ml; se utilizaron 10 ml de D-MEM completo por placa con 96 pozos. A continuación cada suspensión de células se distribuyó a razón de 100 μ l por pozo. Se sembró una caja con 96 pozos, por cada dilución.

Aproximadamente 15 días después de la clonación se realizó la determinación de anticuerpos por el método de ELISA en el sobrenadante de las clonas en las que el crecimiento fuera evidente, siempre y cuando ésta procediera de una sola célula. Con el fin de expandir todas aquellas clonas de las cuales se obtuvieran resultados positivos, éstas se pasaron a cajas con 24 pozos y posteriormente a botellas para cultivo T-25 (Costar, Cambridge MA. USA).

CONGELACION DE CELULAS

Para la congelación de células de mieloma, híbridos y clonas se utilizó un medio para congelación de células el cual se preparó en el momento de congelar y se mantuvo a 4°C. Dicho medio estaba compuesto por suero fetal bovino al 50%, Dimetilsulfóxido (DMSO) al

10%(Sigma, Chemical Co., St. Louis Mo. USA) y D-MEM completo al 40%.

Las células en fase de crecimiento exponencial (10^6 - 10^7) se cosecharon y se centrifugaron a 200 g durante 5 min, el paquete celular se resuspendió en 1.5 ml de medio para congelar, esta suspensión se transfirió a un tubo para congelación de células (Costar, Cambridge MA. USA).

Los criotubos se depositaron en un recipiente de poliestireno y se almacenaron a -70°C durante 8 días al cabo de los cuales, los tubos se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido para su conservación prolongada.

PURIFICACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-*E. histolytica*

Ratones Balb/c de 6 a 8 semanas de edad, fueron utilizados con el fin de obtener una mayor cantidad de anticuerpos monoclonales. A dichos animales se les administraron 200 μl de Pristan (2,6,10,14 tetrametilpentadecano Sigma, Chemical Co., St. Louis Mo USA) vía intraperitoneal 7 días previos a la inoculación de las células híbridas productoras de anticuerpos, las cuales se administraron a razón de 2×10^6 células suspendidas en 200 μl de D-MEM. Los animales permanecieron en observación durante 7 a 14 días hasta que el líquido de ascitis se hizo evidente en la cavidad abdominal de cada uno de los ratones. Posteriormente se puncionó la cavidad abdominal obteniendo aproximadamente 5 ml de líquido de ascitis por ratón.

Con el objeto de eliminar células y eritrocitos, el líquido de ascitis así obtenido se centrifugó a 200 g durante 30 min a 4°C . El sobrenadante se almacenó a -20°C .

Una vez obtenido el total de líquido de ascitis de cada clona, se procedió a precipitarlo con una solución saturada de sulfato de amonio (Merck de México, S.A.) al 50% V/V, agregándolo gota a gota, agitando la muestra y en baño de hielo durante 30 min. A continuación el precipitado se centrifugó a 5000 g durante 15 min a 4°C , el botón se suspendió en solución salina isotónica, repitiendo el mismo procedimiento en tres ocasiones, el último botón se solubilizó en una solución de boratos 0.016 M pH 8. Posteriormente se dializó contra la misma solución, realizando de 3 a 5 cambios.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

El análisis electroforético del antígeno de *E. histolytica* se realizó en geles de poliacrilamida al 7.5% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) en condiciones no reductoras, de acuerdo con el método descrito por Laemmli¹⁴⁹. Las proteínas separadas por su peso molecular en el gel de poliacrilamida se transfirieron a papel de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, 0.45 micras) siguiendo la técnica descrita por Towbin¹⁵⁰.

La transferencia se realizó en una cámara de electrotransferencia (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco CA. USA) la cual contenía una solución amortiguadora de tris-glicina 0.2M pH 8.3 y metanol al 20%. Aplicando una corriente de 100 volts durante 90 min aproximadamente.

El papel se cortó en tiras de 4 mm de ancho colocándolas en placas de 8 carriles (Transtar 96 Costar, Cambridge MA. USA) las cuales se bloquearon con tris-HCl 10 mM, NaCl 0.15 M pH 7.4 (Merck de México, SA) (TBS), leche descremada al 5% (Sveltes, Nestlé, Coatepec, Ver., México) y azida de sodio al 0.02% durante 12 hrs, en agitación suave y a 4°C. A continuación las tiras se lavaron con TBS y se incubaron con los anticuerpos monoclonales IgA específicos y con anticuerpos monoclonales no específicos como controles (IgA de mieloma de ratón TPC15, Sigma, Chemical Co., St. Louis Mo. USA). La reacción antígeno-anticuerpo fué detectada con un anticuerpo anti-IgA de ratón acoplado con la enzima peroxidasa (Zymed Laboratories, San Francisco, CA. USA), el cual se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente y en agitación suave. Se procedió a lavar las tiras con TBS en tres ocasiones y posteriormente con Tris-HCl 10 mM pH 6.8 (TB). La reacción se reveló con un volumen de 4-cloro-1-naftol al 0.3% (Sigma, Chemical Co., St. Louis Mo. USA) en metanol mas cuatro volúmenes de TB adicionado con 33 µl de H₂O₂ (Merck de México, SA) por ml de mezcla, se dejó reaccionar por espacio de 5 a 30 min, bloqueando la reacción con abundante agua destilada.

INMUNOFLUORESCENCIA

Para la inmunofluorescencia se utilizaron trofozoitos de *E. histolytica* HMI:IMSS cultivados en medio axénico y en fase de crecimiento exponencial, se centrifugaron

a 200 g por 5 min y a 4°C, el botón se resuspendió en PD adicionada de glutaraldehído al 0.25% (Merck de México, S.A.) y se incubó durante 30 min en hielo. A continuación los trofozoitos se lavaron en tres ocasiones con PD ajustándolos a una concentración de 2×10^5 células/tubo; se centrifugó nuevamente y el botón se resuspendió en 250 μ l del líquido de ascitis, realizando una dilución tal, que la concentración proteica se encontrara entre 5-10 mg/ml. Los trofozoitos fueron incubados en hielo por 30 min y lavados con solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M (PBS) pH 7.4. A continuación se agregó la anti-IgA fluoresceínada (1:100), se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS y el botón se resuspendió en una solución de formaldehído al 4%, la fluorescencia fué observada en un microscopio de epifluorescencia (Univa R.C. Reichert, Austria).

RESULTADOS

INMUNIZACION

Los animales inmunizados con el extracto de membranas en ambos esquemas de inmunización en presencia de MDP (grupo 1) ó TC (grupo 2), respondieron con la síntesis de anticuerpos anti-amibianos tanto a nivel local como sistémico (Tablas I y II) sin embargo, en el caso del grupo 2 parece haber preferentemente una respuesta de anticuerpos de la clase IgA a nivel intestinal, a diferencia de lo que ocurre en el grupo 1 donde la respuesta de anticuerpos IgG parece predominar en ambos compartimentos (Tablas I y II).

HIBRIDIZACION

Los resultados de la fusión de células de animales inmunes y células de mieloma murino Sp²/0-Ag14 se muestran en la tabla III como se puede observar la eficiencia de fusión en general fue baja, sin embargo, de los animales inmunizados en presencia de MDP se lograron obtener siete híbridos diferentes provenientes todos de placas de Peyer, cinco de los cuales produjeron anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* de isotipo IgA y dos de isotipo IgG. La utilización en este mismo grupo de células de bazo dieron como resultado la producción de once híbridos, productores de anticuerpos anti-amibianos con isotipo IgG.

En el caso de los animales del grupo 2 (inmunizados en presencia de TC) los

seis híbridos provenientes de placas de Peyer produjeron anticuerpos anti *E. histolytica* con isotipo IgA. De la misma forma se obtuvieron dieciocho híbridos productores de anticuerpos anti amebianos con isotipo IgG (células de bazo y ganglios mesentéricos) y tres híbridos productores de anticuerpos de la clase IgA, estos últimos provenientes de células de bazo.

Tabla I. Vía de Inmunización y títulos de anticuerpos anti-*E. histolytica* en fluido intestinal

| Grupo | Vía de inmunización | Anticuerpos | |
|-------|---------------------|-------------|-------|
| | | IgA | IgG |
| 1 | 2IG-MDP+2IP | 0.370 | 0.435 |
| 2 | 2IP+3IG-TC | 0.809 | 0.310 |

ELISA del fluido intestinal de los animales utilizados para la fusión. Los valores corresponden al promedio de la densidad óptica (490 nm) menos el valor del promedio obtenido en el grupo control.

Tabla II. Vía de Inmunización y títulos de anticuerpos anti-*E. histolytica* en suero

| Grupo | Vía de Inmunización | Anticuerpos | |
|-------|---------------------|-------------|-------|
| | | IgA | IgG |
| 1 | 2IG-MDP+2IP | 0.708 | 1.160 |
| 2 | 2IP+3IG-TC | 0.576 | 1.855 |

ELISA del suero de los animales utilizados para la fusión. Los valores corresponden al promedio de la densidad óptica (490 nm) menos el valor del promedio obtenido en el grupo control.

ESPECIFICIDAD

Posterior a la detección de los pozos positivos de los híbridos anti ameba obtenidos, se procedió al estudio de la especificidad de éstos, se encontró que cinco de dichos híbridos resultaron ser específicos para *Entamoeba histolytica*. De estos, tres correspondieron a los productores de anticuerpos anti ameba con isotipo IgA y dos a los de isotipo IgG (Tabla IV) de ellos se seleccionaron las clonas F1P1D4 y F1P1D5 para su posterior caracterización. El resto de los híbridos probados no fueron específicos ya que presentaron reacción cruzada con otras cepas de *Entamoeba* y con otros parásitos intestinales (datos no mostrados). Cabe mencionar que

dicha prueba se realizó tanto con los híbridos como con las clonas obtenidas.

Tabla III. Híbridos productores de anticuerpos anti-amiba

| Vía de Inmunización | Procedencia de las células | Pozos Probados | Clase de anticuerpos anti <i>E. histolytica</i> | |
|---------------------|----------------------------|----------------|---|-----|
| | | | IgG | IgA |
| 2IG-MDP+2IP | PP | 24 | 2 | 5 |
| | Bazo | 18 | 11 | 0 |
| 2IP+3IG-TC | PP | 9 | 0 | 6 |
| | Bazo | 23 | 17 | 3 |
| | GL | 17 | 1 | 0 |

No se obtuvieron híbridos productores de IgM.

Tabla IV. Especificidad de anticuerpos monoclonales anti-*E. histolytica*

| Clonas | Isotipo | <i>E. histolytica</i> | | <i>E. invadens</i> | Entamoeba semejante a <i>E. histolytica</i> (Laredo) |
|---------|---------|-----------------------|---------|--------------------|--|
| | | HMI:IMSS | HK9:NIH | | |
| F1P1D4 | IgA | 0.860 | 0.930 | 0.090 | 0.080 |
| F1P1D5 | IgA | 0.410 | 0.470 | 0.080 | 0.060 |
| F1P2D5 | IgA | 0.391 | 0.504 | 0.100 | 0.090 |
| F1P1G10 | IgG | 0.384 | 0.442 | 0.090 | 0.090 |
| F2G1F2 | IgG | 0.354 | 0.358 | 0.040 | 0.060 |

ELISA de los sobrenadantes de las células en cultivo. Los valores corresponden al promedio obtenido de la densidad óptica (490 nm) menos el valor del promedio obtenido en el grupo control.

INMUNOFLUORESCENCIA

Con el objeto de determinar la localización de los epítopes reconocidos por los anticuerpos IgA anti-*E. histolytica* previamente seleccionados se hizo inmunofluorescencia indirecta, los resultados se muestran en la figura 1. Como puede observarse, ambos anticuerpos reconocen epítopes asociados a la membrana citoplásmica. Una forma inequívoca de probar esta asociación es la de realizar la inmunofluorescencia en condiciones que permitan la redistribución de los antígenos de la membrana¹⁷⁶. En esta misma figura se puede observar la formación de casquetes sobre la superficie de los trofozoitos.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Con el objeto de determinar en que fracción antigénica del extracto de membranas de *E.histolytica* se encuentra localizado el epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales seleccionados, se hizo electroforesis de dicho extracto en geles de poliacrilamida SDS al 7.5%, dicha electroforesis se realizó en condiciones no reductoras; a continuación se procedió a transferir las diferentes proteínas separadas en los geles a papel de nitrocelulosa, el resultado de la reacción de ambos anticuerpos monoclonales con las tiras de nitrocelulosa se muestra en la figura 2, como puede observarse, el anticuerpo monoclonal F1P1D5 parece reconocer un epítipo localizado en dos bandas proteicas de aproximadamente 60 y 30 KDa (Carril C). Así mismo el anticuerpo F1P1D4 reconoce un doblete de alrededor de 200 KDa (Carril D).

En la figura 3 se muestra el resultado de la electroforesis de la IgA en condiciones reductoras y no reductoras, producida por la clona F1P1D5 una vez purificada en columna de afinidad (sepharosa-anti IgA de ratón; Zymed Laboratories, San Francisco, CA. USA), el peso molecular aparente de dicha IgA (>200 kDa) podría sugerir el que se trate de una IgA dimérica.

DISCUSION

Tanto en la mucosa del tracto respiratorio como en el digestivo se sabe que existe una continua exposición a antígenos virales, bacterianos y/o parasitarios. Por otro lado sabemos que la IgA es la principal inmunoglobulina que se produce a este nivel, y aunque se conoce poco acerca del significado biológico de la respuesta inmune secretora en particular en la amibiasis, es posible especular que así como en otros sistemas, la IgA pueda jugar un papel activo en la inmunidad local contra *E. histolytica*¹⁵¹. Con el objeto de estudiar el papel de esta inmunoglobulina en los mecanismos de defensa locales contra este parásito nos dimos a la tarea de producir un anticuerpo monoclonal de clase IgA, en este caso en particular específico para *E. histolytica*.

Una de las limitantes en la producción de tales anticuerpos es que su inducción a través de la inmunización por vía oral depende importantemente de las características del inmunógeno, la dosis del inmunógeno, la combinación de éste o no con algún adyuvante de la

síntesis de IgA, la vía de inmunización y la cepa de ratón utilizada. Por otro lado se sabe que la vía oral como alternativa para la inducción de la respuesta inmune parece no ser del todo confiable, ya que existen evidencias de que su utilización es capaz de inducir estados de tolerancia específicamente a nivel de la respuesta inmune sistémica y por otro lado existen modelos en donde este procedimiento induce una respuesta secretora altamente eficiente¹⁵². Swarbrick y colaboradores (1979) demostraron que la administración previa del antígeno por vía oral puede inducir al parecer, no solo una supresión en la inducción de anticuerpos séricos sino también una disminución en la absorción subsecuente de antígenos¹⁵³.

Existen evidencias que sugieren una posible correlación entre la vía de inmunización utilizada y la clase de inmunoglobulinas producidas, así encontramos que al inmunizar en forma repetida por vía oral a ratones Balb/c con trofozoitos de *E.histolytica* es posible inducir una producción de anticuerpos antiambianos de clase IgA en el fluido intestinal de los animales tratados, cabe mencionar que dichos anticuerpos se encontraron ligeramente elevados¹³¹. Cabré y colaboradores (1969) reportaron que la inmunización local con ferritina favorece la estimulación de células B precursoras de IgA antiferritina en folículos linfoides submucosos. Se ha demostrado que es posible inducir anticuerpos de clase IgA posterior a la inmunización sistémica¹⁵⁴ o combinando las vías local y sistémica¹⁵⁵. Por el contrario, existen algunos reportes en los que se afirma que la vía sistémica no es eficiente¹⁵⁶ o más aún que dicha vía tiene un efecto supresor sobre la respuesta de IgA a nivel de las mucosas¹⁵⁷.

Basados en los resultados anteriores, en este trabajo decidimos utilizar adyuvantes de la respuesta inmune secretora con el objeto de incrementar la respuesta humoral y por consiguiente inducir la producción de anticuerpos de clase IgA anti-*E.histolytica*. Se ha descrito que el MDP es un adyuvante capaz de estimular tanto la respuesta de anticuerpos locales como sistémicos y la forma de administración del antígeno y el MDP es condición importante para determinar la clase de anticuerpos que se inducen¹⁵⁸. De esta forma al inocular un antígeno con MDP en aceite mineral se induce un aumento en la producción de inmunoglobulinas de clase IgG2¹⁵⁹. La administración intragástrica de MDP mas *Streptococcus mutans* a ratas, induce un aumento en la respuesta de IgA tanto en suero como en saliva, lo

cual se correlaciona en forma directa con la disminución en cuanto a la frecuencia de presentación de caries dentales por dicho microorganismo¹⁶⁰. El MDP también es capaz de actuar como adyuvante en la inducción de anticuerpos específicos para una gran variedad de antígenos, tales como bacterias, virus y protozoarios entre los que se encuentran *Brucella*, toxoide diftérico y tetánico, influenza, Herpes simplex tipo I y *Trypanosoma brucei*¹⁵⁸.

La forma como actúa el MDP es múltiple, se ha observado que es capaz de aumentar la actividad de células T cooperadoras¹⁶¹, posee actividad mitogénica para linfocitos B¹⁶² y timocitos¹⁶³, estimula la fagocitosis¹⁶⁴, aumenta la adherencia y propagación de macrófagos y aumenta la producción de prostaglandinas y colagenasa¹⁵⁸; esto contribuye a la amplificación de la respuesta inmune.

En nuestros resultados, encontramos que la utilización de MDP como adyuvante parece favorecer la producción de anticuerpos tanto de IgA como de IgG en ambos compartimentos (Tabla I y II), fenómeno que es diferente cuando se utiliza TC ya que ésta favorece claramente la producción local de IgA (Tabla I) y de IgG sistémica lo cual se relaciona con los resultados obtenidos por otros grupos^{165,166}. Cabe mencionar, que la utilización de TC como adyuvante en esquemas de inmunización por vía oral evita el estado de tolerancia¹⁶⁷, no es menos importante el hecho de que al parecer la TC es capaz de "regionalizar" la respuesta, así encontramos que las células plasmáticas productoras de anticuerpos anti-TC son más abundantes en áreas de la mucosa que están directamente expuestas a la TC^{168,169}.

Se considera que el principal mecanismo para que la TC participe en la respuesta inmune como adyuvante, radica en su capacidad para inhibir las células supresoras en el tejido linfóide asociado al intestino, situación que podría estar dada por las propiedades del receptor para la toxina colérica en este tipo de células o a cambios en la concentración de AMPc intracelular¹⁷⁰ siendo al parecer las células T supresoras más susceptibles a la inhibición de la proliferación por el AMPc que las células T cooperadoras¹⁷¹.

Un avance importante en el área de la inmunología es sin lugar a dudas el contar con una técnica que permita la producción de anticuerpos monoclonales y más aun si dichos

anticuerpos pertenecen al isotipo IgA. El contar con un anticuerpo con estas características facilita el estudio de los mecanismos efectores de dichos anticuerpos a nivel del sistema inmune secretor¹⁵¹.

La eficiencia de la fusión de células de animales inmunes con células de mieloma Sp2/O-Ag14 fué baja, sin embargo, pudimos obtener un número razonable de híbridos productores de IgA anti-*E.histolytica* de los cuales cinco resultaron específicos (Tabla IV). En general la eficiencia de fusión encontrada por otros grupos, cuando se utiliza para inmunización la vía oral, para tratar de obtener monoclonales de isotipo IgA es también baja^{151,172}. En estudios previos la frecuencia mas alta de hibridomas productores de IgA fueron obtenidos utilizando células inmunes provenientes del sistema linforeticular asociado al intestino, específicamente de placas de Peyer¹⁷³. Los híbridos producidos de esta forma pueden secretar IgA polimérica o monomérica¹⁷⁴.

La homogeneidad propia de los anticuerpos monoclonales los convierte en una herramienta útil no solo para la selección y purificación de antígenos, sino también en el estudio de la protección contra procesos infecciosos como podría ser el caso de las parasitosis. Desde el punto de vista inmunológico, se piensa que los antígenos de la membrana celular son las principales moléculas que se ponen en contacto con el sistema inmune del huésped lo cual podría favorecer la eliminación del parásito a través de mecanismos citolíticos^{175,176}. Sin embargo, un buen número de trofozoitos son capaces de evadir la lisis mediada por anticuerpos y complemento debido a que *E. histolytica* posee una gran capacidad de recambio de proteínas de la membrana plasmática, lo que le permite eliminar los anticuerpos que se unen a su superficie³².

Utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta, encontramos que los anticuerpos producidos por las clonas FIPID4 Y FIPID5 parecen estar dirigidos a determinantes antigénicos presentes en la superficie celular, lo cual se demuestra por la redistribución de estos epítopes y la formación de casquetes (Fig 1).

Por último, los resultados obtenidos mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia (Fig 2) demuestran que los anticuerpos monoclonales IgA

obtenidos de las clonas en estudio, reconocen epítopes relacionados con diferentes fracciones antigénicas, así tenemos que la clona FIPID4 reconoce un doblete de aproximadamente 200 kDa de peso molecular y la clona FIPID5 reconoce dos fracciones antigénicas, una fracción de 60 kDa y otra de 30 kDa.

En la literatura se han descrito distintas fracciones antigénicas las cuales han sido identificadas en su gran mayoría como moléculas de superficie, su localización hace suponer que dichas fracciones juegan un papel importante en el proceso de adherencia de los trofozoitos a las células blanco^{80,81,82,84,86}. Estos estudios han sido enfocados a entender los principales mecanismos de la relación entre el huésped y el parásito, sin embargo la utilización de antígenos preparados mediante metodologías diferentes ofrece la desventaja de ser muy heterogeneos lo que hace particularmente difícil la evaluación comparativa de resultados obtenidos por diferentes grupos.

De esta forma se han descrito un número importante de fracciones antigénicas con un peso molecular igual o aproximado a las bandas reconocidas por los anticuerpos monoclonales aquí obtenidos.

En 1987 el grupo de Rosales Encina y Meza y colaboradores describieron una lectina de 220 kDa aislada a partir de trofozoitos de *E. histolytica* HM1-IMSS, dicha proteína es capaz de aglutinar eritrocitos humanos y al ser bloqueada por medio de un anticuerpo monoclonal se inhibe la unión entre trofozoitos y monocapas de células MDCK *in vitro*^{84,86}.

Por otro lado, en estudios encaminados a la identificación de antígenos del parásito reconocidos por anticuerpos séricos de pacientes con amibiasis intestinal se encontró que, fracciones antigénicas de peso molecular de 62 kDa y 30 kDa fueron reconocidas por el suero de dichos pacientes a una frecuencia mayor al 50%, no siendo reconocidas por los sueros controles de individuos extranjeros¹⁷⁷. Dichas fracciones podrían corresponder a las reconocidas por el anticuerpo monoclonal FIPID5.

Blakely y colaboradores (1990) reportaron una proteína de 30KDa como característica de cepas patógenas, dicha proteína no es reconocida por anticuerpos antimibianos de individuos infectados en lisados amibianos provenientes de cepas no

patógenas. Además por inmunofluorescencia fué posible demostrar que dicho antígeno se encuentra presente sobre la superficie del trofozoito¹⁷⁸.

En el caso de los anticuerpos producidos por la clona F1P1D5 éstos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida después de haber sido purificados en columnas de afinidad de sepharosa 4B-acopladas a anti-IgA de ratón producida en conejo (Zymed Laboratories, San Francisco, CA. USA).

La IgA purificada y separada en geles reductores y no reductores parece ser una inmunoglobulina dimérica ya que el peso molecular observado en los geles en condiciones no reductoras se encuentra por arriba de 200 KDa. Cabe mencionar que en el caso de la cepa de ratones utilizados (Balb/c) la IgA producida tiene cadenas ligeras que se encuentran asociadas a las cadenas pesadas por enlaces no covalentes, los cuales son eliminados mediante el tratamiento con la solución amortiguadora de la muestra la cual contiene SDS, por ello se observa una masa molecular de aparente menor peso molecular al esperado para una molécula de IgA murina completa¹⁷². Lo que queda claro en la figura 3 es que la IgA producida por la clona F1P1D5 no es un monómero y que su peso molecular sugiere fuertemente que se trate de un dímero.

Por otro lado, una vez caracterizados los anticuerpos monoclonales de clase IgA se han hecho estudios sobre las características biológicas de los anticuerpos estudiados, especialmente orientados hacia el estudio de su participación en el proceso de adhesión de los trofozoitos a células blanco así como a la mucosa intestinal en animales de experimentación¹⁷⁹. Sabemos que este proceso de adhesión es el primero de tres pasos consecutivos involucrados en el daño tisular (adherencia, citolisis, y fagocitosis)¹⁸⁰. Los resultados mostraron que ambos monoclonales probados son capaces de inhibir la adherencia tanto *in vitro* como *in situ*. El poder contar con un reactivo como el que hemos producido permitirá ampliar nuestro conocimiento en cuanto a la participación de la respuesta inmune secretora en la compleja dinámica de la relación huésped-parásito en la amebiasis.

BIBLIOGRAFIA

1. Ortiz-Ortiz L, Avella ML. Respuesta inmune en infecciones por *Entamoeba histolytica*. *Immunologia* 1984; 3:5.
2. Walsh JA. The world problem of amebiasis: Current status, research and opportunities for advancement. In *tropical and Geographic Medicine*, ed K.S. Warren A. A. F. Mahmoud. New York: McGraw-Hill. 1984.
3. Gitler C, Mirelman D. Factors contributing to the pathogenic behavior of *Entamoeba histolytica*. *Ann Rev Microbiol* 1986;40:237.
4. Sepúlveda B. Amebiasis: Host-Pathogen Biology. *Rev Infect Dis* 1982;4:836.
5. Sepúlveda B. La amebiasis invasora por *Entamoeba histolytica*. *Gac Med Mx* 1970;100:201.
6. Martínez Palomo A. Biología de la *E. Histolytica*. En: Martínez Palomo A. Amebiasis. México, Editorial Medica Panamericana. 1989:17.
7. Chévez A, Corona D, Segura M, Iturbe-Alessio I. La pinocitosis como expresión anabólica de *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med (Méx)* 1972;3(Supl 2):276.
8. Chévez A, Iturbe-Alessio I, Segura M, Corona D. Fagocitosis de eritrocitos humanos por *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med (Méx)* 1972;3(Supl 2): 275.
9. Montalvo FE, Reeves RE, Warren LG. Aerobic and anaerobic metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* 1971;30:249.
10. Weinbach EC, and Diamond LS. *Entamoeba histolytica*: I Aerobic metabolism. *Exp Parasitol* 1974;35:232.
11. Weinbach EC. Biochemistry of enteric parasitic protozoa. *Trends Biochem Sci* 1981;6:254.
12. Dobell C. The amoebae living in man. A zoological monograph. John Bale, Sons & Danielsson, London. 1919.
13. Martínez-Palomo A, Martínez-Baez M. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. X. Amebiasis. *Rev Infect Dis* 1983;5:1093.
14. Sepúlveda B and Martínez-Palomo A. Immunology of amoebiasis by *Entamoeba histolytica* In: S. Cohen and K.S. Warren (Eds) *Immunology of Parasitic Infections*. 2nd Edn., Blackwell, Oxford, 1982; 170.
15. Salata RA, Ravdin JI. Review of the human immune mechanism directed against *Entamoeba histolytica* *Rev Infect Dis* 1986; 8: 261.
16. Gutiérrez G, Ludlow A, Espinoza G, Herrera S, Muñoz O, Ratoní N, Sepúlveda B. National serologic survey II. Search for antibodies against *Entamoeba histolytica* in Mexico. In: Sepúlveda B, Diamond L.S. eds. Amebiasis. México. D.F. Instituto Mexicano del Seguro Social. 1976; 609.
17. Gathiran V, Jackson TFGH. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *S Afr Med J* 1987;72: 669
18. World health Organization Expert Committee. Amebiasis. WHO Technical Report Series. 1969;421:1

19. Nanda R, Baveja B, Anand BS. *Entamoeba histolytica* Cyst passers: Clinical Features and outcome in untreated subjects. *Lancet* 1984;2:301.
20. Ravdin JI. Intestinal disease caused by *Entamoeba histolytica*. In: Ravdin J.I. ed. Amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica* New York: John Willey and Sons 1988: 495.
21. Adams EB, MacLeod IN. Invasive amebiasis. I. Amebic dysentery and its complications. *Medicine* 1977; 56:315.
22. Gutiérrez-Trujillo G. Características principales de la amebiasis invasora en el niño. *Arch Invest Med (Méx)* 1980; 11(Supl):S281.
23. Bautista J. Tratamiento quirúrgico de la amebiasis invasora. *Arch Invest Med (Méx)* 1978; 9(Supl):S411.
24. Adams EB, MacLeod IN. Invasive amebiasis II. Amebic liver abscess and its complications. *Medicine* 1977; 56:325
25. Brandt H, Pérez-Tamayo R. Pathology of human amebiasis. *Hum Pathol* 1970; 1:351.
26. Sepúlveda B. Reacciones de hemaglutinación y de precipitación con antígeno amebiano en amebiasis invasora. *Arch Invest Med (Méx)* 1970; (Suppl): III.
27. Alvarez-Alva R, De la Loza-Saldívar A. Frecuencia del absceso hepático amebiano en hospitales del Instituto Mexicanos del Seguro Social en la República Mexicana. *Arch Invest Med (Méx)* 1971; 2(Supl):S327.
28. Gutiérrez G, Loza Saldívar de la A, Cetina-Ayuso R. Epidemiología de la amebiasis en México. *Boletín mensual epidemiología* 1986;1(4):45.
29. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986;8:228.
30. Bray RS, Harris WG. The epidemiology of infection with *Entamoeba histolytica* in the Gambia, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977;71:401.
31. Hossain MM, Ljungstrom I, Glass RI, Lundin L, Stoll BJ, Huldt G. Amebiasis and giardiasis in Bangladesh parasitological and serological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77:552.
32. Calderón J, Muñóz Ma. de L, Acosta HM. Surface redistribution and release of antibody induced caps in *Entamoeba*. *J Exp Med* 1980; 151:184.
33. Diamond LS, Harlow R, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978;72:431.
34. Tanimoto-Weki M, Sepúlveda B, Vázquez-Saavedra JA, Landa L. Lesiones producidas en el hígado de hamster por inoculación de *Entamoeba histolytica* cultivada en medio axénico. *Arch Invest Med (Méx)* 1978;9 (Supl 1):257.
35. Martínez-Palomo A, González-Robles A, De la Torre M. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by Con A. *Nature New Biol* 1973;245:186.
36. Orozco E, Martínez-Palomo A, López Revilla R. Un modelo *in vitro* para el estudio de la virulencia de *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med (Méx)* 1978; 9(Supl 1):257.
37. Beachey EH. Bacterial adherence. Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis* 1981;143:325.

38. Ravdin JI, Guerrant RL. Role of adherence in pathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue cells and human erythrocytes. *J Clin Invest* 1981;68:1305.
39. Orozco E, Martínez-Palomo A, González Robles A. Interacciones lectina-receptor median adhesión de *Entamoeba histolytica* a células epiteliales. Relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. *Arch Inves Med (Méx)*1982;13:159.
40. Ravdin JI, Murphy CF, Salata R. N-acetyl-D-galactosamine inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica* I. Partial purification and relation to amebic virulence *in vitro*. *J Infect Dis* 1985;151:804.
41. Knudsen KA, Horwitz AF, Buck CA. A monoclonal antibody identifies a glycoprotein complex involved in cell-sustratum adhesion. *Cell* 1985;91:1029.
42. Reeves RE, Bischoff JM. Classification of *Entamoeba histolytica* especies by means o electrophoretic properties of amebac enzymes. *J Parasitol* 1968; 54:594.
43. Blanc D, Nicholls R, Sargeant PG. Experimental production of new zymodemes of *Entamoeba histolytica* supports the hypothesis of genetic exchange. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989;83:787.
44. Sargeant PG. Zymodemes expressing possible genetic exchange in *Entamoeba histolytica* *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79:86.
45. Sargeant PG, Jackson TFHG, Wiffen S, Bhojnani R, Williams JE, Felmingham D, Goldmeier D, Allason-Jones E, Mindel A, Phillips E. The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in laboratory diagnosis. *Arch Invest Med (Méx)*1987;18:69.
46. Sargeant PG, Jackson TFHG, Wiffen SR, Bhojnani R. Biological evidence of genetic exchange in *Entamoeba histolytica* *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988;82:862.
47. Keene WE, Pettit MG, Allen S, Mckerrow JH. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1986: 163:536.
48. Reed SL, Keene We, Mckerrow H, Gigli I. Cleavage of C3 by a neutral cysteina proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Immunol* 1989;143;189.
49. Reed SL, Keene WE, Mckerrow JH. Thiol proteinase expression correlates with pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 1989;27:2772
50. Garfinkel LI, Giladi M, Huber M, Gitler C, Mirelman D, Revel M., Rosenblatt S. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. *Infect Immun* 1989;57:926.
51. Martínez Palomo A. The pathogenesis of amocbiasis. *Parasitology Today* 1978;4:111.
52. Kagan IG. Pathogenicity of *Entamoeba histolytica* *Arch Invest Med (Méx)*1974; 5(Supl 2):457.
53. Tsutsumi V, Mena-López R, Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 1984;117:81.
54. Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. *Am J Pathol* 1988;130:112.
55. Becker I, Pérez-Tamayo R, Montfort I, Alvizouri AM, Pérez-Montfort R. *Entamoeba histolytica*: Role of amebic proteinases and polymorphonuclear leukocytes in acute experimental amebiasis in the rat. *Exp Parasitol* 1988;67:268.

56. Pérez-Tamayo R, Martínez RD, Montfort I, Becker I, Tello E, Pérez-Montfort R. Pathogenesis of acute experimental amebic liver abscess in hamsters. *J Parasitol* 1991; 77:982.
57. Gilman R, Prathap K. Acute intestinal amoebiasis: protoscopic appearances with histopathological correlation *Ann Trop Med Parasitol* 1971;65:359.
58. Pittman FE, El-Hashim WK, Pitmani JC. Studies of human amoebiasis. II light and electron microscopic observation of colonic mucosa and exudate in acute amebic colitis. *Gastroenterology* 1973;65:588.
59. Griffin JL. Human amebic dysentery. Electron microscopy of *Entamoeba histolytica* contacting ingesting and digesting inflammatory cells. *Ann J Trop Med Hyg* 1972;21:895.
60. Pérez-Tamayo R, Becker I, Montfort I, Pérez-Montfort R. Pathobiology of amoebiasis. In amoebiasis: Infection and Disease by *Entamoeba histolytica*, ed. Kretschmer, R. Boca Raton, FL: CRC Press 1990:123
61. Ravdin JI, Murphy CF, Guccrant RL, Longkrug SA. Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 1985;152:542.
62. Ravdin JI, Sperlakis N, Guccrant RL. Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 1982;146:335.
63. Long-Krug SA, Fischer KJ, Hysmith RM, Ravdin JI. Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. *J Infect Dis* 1985;152:536.
64. Biagi FF, Beltrán HF. The challenge of amoebiasis: Understanding pathogenic mechanism. *International Rev Trop Med* 1969;3:219.
65. Aguirre-García J. Peculiaridades histopatológicas de la lesión amebiana. *Arch Invest Med (Méx)* 1970;1 (Supl 1):1475.
66. Kretschmer R, Salinas-Carmona MC, López-Ozuna M, Avila ME. Efecto de *Entamoeba histolytica* sobre la quimiotaxis de monocitos humanos. *Arch Invest Med (Méx)* 1980; 11(Supl 1):147.
67. Gohs TN, Sen PC. Phagocytic function in amoebiasis. *Indian J Med Res* 1980; 71:207.
68. Kretschmer R, Collada ML, Pacheco MG, Salinas MC, López Osuna M, Lecuona M, Castro EM, Arellano J. Inhibition of human monocyte locomotion by product of axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* 1985;7:527.
69. Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Shaudin, 1903 and *Entamoeba histolytica* like amebae. *J Parasitol* 1969; 54: 1047.
70. Acosta H, Muñoz ML, Calderón J. Caracterización de moléculas superficiales de *E. invadens*. *Arch Invest Med (Méx)* 1978;1:175.
71. Chang SM, Lim CM, Dusanic DG, Cross JH. Antigenic analysis of two axenized strains of *Entamoeba histolytica* by two dimensional immunoelectrophoresis. *Am J Trop Med Hyg* 1979;28; 845.
72. Krupp IM. Definition of the antigenic pattern of *Entamoeba histolytica* and immunoelectrophoretic analysis of patients response to amebic disease. *Am J Trop Med Hyg* 1977;26:387.
73. Thompson PE, Graedel SK, Schneider LR, Stucki WP, Gordon RM. Preparation and evaluation of standardized antigen from axenic cultures of *Entamoeba histolytica*. *Bull WHO* 1968;34:349.
74. Ali-Khan Z, Meerovitch E. Studies of the purification of *Entamoeba histolytica* antigen by gel filtration I. Some physicochemical properties of the isolated fraction. *Can J Microbiol* 1970;16:485.

75. Aust-Kettis A, Thorstenson R, Utter G. Antigenicity of *Entamoeba histolytica* strain NIH:200: a survey of clinically relevant antigenic components. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32:512.
76. Krupp IM. Definition of the antigenic pattern of *Entamoeba histolytica* and immunoelectrophoretic analysis of the variation of patient response to amebic disease. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26:387.
77. Chang SM, Lin CM, Dusanic DG, Cropps JH. Antigenic analysis of by two axenized strains of *Entamoeba histolytica* two dimensional immunoelectrophoresis. *Am J Trop Med Hyg* 1979;28:845.
78. Sánchez Nercida M, García Tamayo F, Kumate J. Inmunoquímica de proteínas inmunogénicas de *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med (Méx)* 1978;9 (Suppl 1): 149.
79. Krupp IM. Protective immunity to amebic infection demonstrated in guinea pigs. *Am J Trop Med Hyg* 1974; 23:355.
80. Arroyo R, Orozco E. Localization and identification of adhemiba, a protein wichs participates in the adhesion of *Entamoeba histolytica* to human erithrocytes and epithelian cells. *Arch Invest Med (Méx)* 1986;17(Suppl 1):135.
81. Chadee K, Petri WA, Innes DJ, Ravdin JI. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Clin Invest* 1987;80:1245.
82. Orozco E, Arroyo R, Rodríguez MA, García Rivera G. Identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin using adhesion deficient-mutants and monoclonal antibodies. In molecular strategies of parasitic invasion. Agabian N, Goodman H, Nogueira N. Eds. Alan R, Liss Inc, New York. 1987;531.
83. Ravdin JI, John JE, Johnston LI, Innes DJ, Guerrant RL.. Adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to rat and human colonic mucosa. *Infect Immun* 1985;48:292.
84. Rosales-Encina JL, Meza I, López de León A, Talamás-Rohana P, Rojkind M. Isolation of 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 1987;156:790.
85. Salata RA, Ravdin JI. N-acetyl-D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 1985;151: 816.
86. Meza I, Cázares F, Rosales Encina JL, Talamás-Rohana P, Rojkind M. Use of antibodies to characterize a 220 kilodaltons surface protein from *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 1987;156(5):798.
87. Isibasi A, Santa Cruz M, Ramírez A, Kumate J. Inmunoquímica de una lipopeptidofosfoglicana extraída de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* cepa HK-9:NIH cultivado en medio axénico, utilizando el método de fenol-agua. *Arch Invest Med (Méx)* 1982; 13 (Supl 3):51.
88. Isibasi A, Santa Cruz M, Soto-Montaña X, Ramírez A, Kumate J. Localización en los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* de una lipopeptidofosfoglicana extraída por fenol-agua de la cepa HK-9. *Arch Invest Med (Méx)* 1982; 13 (Supl 3):57.
89. Acosta G, Barranco C, Isibasi A, Campos R, Kumate J. Excreción de anticuerpos de la clase IgA específicos anti-amiba en bilis de ratas inmunizados con trofozoitos de *Entamoeba histolytica* cultivados en medio axénico. *Arch Invest Med (Méx)* 1982;13 (Suppl 3):255.
90. Gitler G, Clef E, Rosenberg I. Citopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Phil Trans R Soc (London)* 1984;307:73.
91. Treviño-García N, Feria-Velasco A, Ruiz de Chávez I, De la Torre M. Lisosomas en *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med (Méx)* 1980:11 (Supl 1):179

92. Sánchez ME, Martínez-Palomo A. Inducción de inmunidad antiamebiasica en primates subhumanos con antígeno lisosomal de *Entamoeba histolytica* II. aislamiento y caracterización del antígeno lisosomal. Arch Invest Med (Méx) 1980;11 (Supl 1):247.
93. Boonpucknanig S, Lynraven GS, Nairn RC, Ward HA. Subcellular localization of *Entamoeba histolytica* antigen. Nature 1967;216:1232.
94. Preston PM, Dumonde DC. Immunogenicity of a ribosomal antigen of *Leishmania enrietti*. Trans R Soc Trop Med 1971;65:18.
95. Johnson W. Ribosomal vaccines I. Immunogenicity of ribosomal fractions isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*. Infect Immun 1972;3:947.
96. Bos HJ, Leijen dekker WJ, van den Eijk AA. *Entamoeba histolytica*: cytopathogenicity including serum effects on contact-dependent and toxin-induced lysis of hamster kidney cell monolayers. Exp Parasitol 1980;50: 342.
97. Labelle-Rich P, Reeves R. The partial purification and characterization of adenosine kinase from *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg 1983;32:976.
98. Lundblad G, Huldt G, Elander M, Lind S, Stettengren K. B-N-acetylglucosaminidase from *Entamoeba histolytica*. Comp Biochem Physiol 1981;68:71.
99. Trisli D. Immunology of *Entamoeba Histolytica* in human and animal hosts. Rev Infect Dis 1982;40:1154.
100. Sepulveda B. Progress in amebiasis. Scand J Gastroenterol 1982;11:153.
101. Kretschmer RR. Immune phenomena in amebiasis. Surv Immunol Res 1984;3:1.
102. Ortiz-Ortiz L, Samacona G, Sepulveda B, Capin NR. Cell mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. Clin Immunol Immunopathol 1975; 4:127.
103. Ganguly NK, Mahajan RC, Sharma S, Chandanani RE, Gupta AK, Dutta DV, Chhutani PN. Cellular reactions to amoebic antigen in invasive amoebiasis: a preliminary communication. Indian J Med Res 1979;69:412.
104. Dramantsein T, Klos M, Gold D, Hahn H. Mitogenicity of *Entamoeba histolytica* extracts for murine lymphocytes. Immunology 1980;41:347.
105. Salata RA, Cox JG, Ravdin JI. The killing of virulent *E. histolytica* trophozoites by phytohemagglutinin-elicited cytotoxic T-lymphocytes. Clin Res 1984; 32: 365A.
106. Ghadirian E, Kongs PAL. Effect of silica on resistance of mice to *Entamoeba histolytica* infection. Infect Immun 1984;45:399.
107. Ghadirian E, Meerovitch E. Macrophage requirement for host defense against experimental hepatic amebiasis in the hamster. Parasite Immunol 1982;4:219.
108. Ghadirian E, Meerovitch E, Kongshaun PAL. Role of macrophages in host defense against hepatic amebiasis in hamsters. Infect Immun 1983;42:1017
109. Salata RA, Pearson RD, Ravdin JI. Interaction of human leukocytes and *Entamoeba histolytica* killing of virulent amebae by the activated macrophage. J Clin Invest 1985;76:491.
110. Elsdon-Dev R. The serology of amoebiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1970; 64:18.

111. Savant T, Sabcharoen A, Charoenpong K, Tantivanich S. Immunological tests in asymptomatic intestinal amoebiasis. *J Trop Med Public Health* 1974; 5:359.
112. Ackers JP. Normal immune responses to protozoan infections. In G. Dick (ed) *Immunological aspects of infectious diseases*. University Park Press, Baltimore 1979:77.
113. Krupp IM. Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1970;19:57.
114. Healy GR, Kagan IG, Gleason NN. Use of the indirect hemagglutination test. In some studies of seroepidemiology of amebiasis in the western hemisphere. *Health and Laboratory Science* 1970;7:109.
115. Maddison SE, Kagan IG, Noyman L. Reactivity of human immunoglobulins in amebiasis. *J Immunol* 1968;100:217.
116. Lee E, Palacios O, Kretschmer R. Localización del anticuerpo anti-amibiano en las inmunoglobulinas del suero humano. *Arch Invest Med (Méx)* 1970; 1(Suppl): S101.
117. Arellano MT, Ortiz-Ortiz L. Algunas propiedades de la globulina específica del suero de pacientes con absceso hepático amibiano. *Arch Invest Med (Méx)* 1974; 5(Suppl): S487.
118. Osisanya JOS, Warhurst DC . Specific anti-amoebic immunoglobulins and the cellulose acetate precipitin test in *Entamoeba histolytica* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980;74:605.
119. Dasgupta A. Immunoglobulin in health and disease. III. Immunoglobulins in the sera of patients with amoebiasis. *Clin Exp Immunol* 1974;16:163.
120. Perches A, Kretschmer R, Lee E, Sepúlveda B. Determinación de inmunoglobulinas del suero en pacientes con amebiasis invasora. *Arch Invest Med (Méx)* 1970; 1 (Supl):S97.
121. Stites DP, Fudenberg HH, Stobo JD, Wells JV. Inmunología básica y clínica. *El Manual Moderno*. 5a. Edición, México, 1985:193.
122. Shaalan M, Baker RP. Detection of coproantibodies in amoebiasis of the colon: a preliminary report. *Am J Clin Pathol* 1970;54:615.
123. Mahajan RC, Agarwal SC, Chuttani PN, Chakra NL. Coproantibodies in intestinal amebiasis. *Indian J Med Res* 1972;60:547.
124. Sharma P, Krishna-Prasad BN, Datta GP. Coproantibodies in intestinal amebiasis using axenic *Entamoeba histolytica* antigen. *Indian J Med Res* 1978; 68:243.
125. Doe WF. Progress report the secretory immune of intestine. *Gut* 1972; 13: 572.
126. Acosta G, Campos R, Barranco C, Isibasi A, Kumate J. Secretory IgA antibodies from bile of immunized rats reactive with trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Ann N Y Acad Sci* 1983;409:760.
127. Grundy MS, Cartwright-Taylor L, Lundin L, Thors C, Huldt G. Antibodies against *Entamoeba histolytica* in human milk and serum in Kenya. *J Clin Microbiol* 1983;17:753.
128. Acosta G, Cote V, Isibasi A, Kumate J. Anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* de clase IgA en el calostro de mujeres mexicanas. *Inmunología* 1985;4:24.

129. O'shea-Alvárez MS, Treviño GMN, Reyes M. Presencia de anticuerpos antiambianos en secreciones de feolon, colon y materia fecal en pacientes con absceso hepático ambiano. Arch Invest Med (Méx) 1985;16:401.
130. Ximénez C, Hernández J, Melendro EI, Ramiro M. Coproanticuerpos y anticuerpos séricos antiambianos en la amebiasis intestinal aguda. Arch Invest Med (Méx) 1990;21(Sup1): 239
131. Villarreal BB, Melendro EI, Ramos F, Ximénez C. Local and systemic antibody response in Balb/c mice immunized with *Entamoeba histolytica* trophozoites. Arch Med Res 1992: 23:69.
132. McNabb Paul C, Tomasi TB. Host defense mechanisms at mucosal surfaces. Ann Rev Microbiol 1981; 35:477.
133. Walker WA, Isselbacher JK, Bloch JK. Intestinal uptake of macromolecules: Effect of oral immunization. Science 1972;117:608.
134. Klipstein FA, Engert RF. Protective effects of active immunization with purified *Entamoeba coli* heat labile enterotoxin in rats. Infect Immun 1979;23:592.
135. Bienstock J, Befus AD. Mucosal Immunology. Immunol 1980;41:249.
136. Koster FT, Tung KS, Gilman RH, Ahmed A, Raham MM, Williams RC Jr. Circulating immune complexes in bacillar y and amebic dysentery. J Clin Lab Immunol 1981;5:153.
137. Pillai S, Mohimen A. A solid-phase sandwich radioimmunoassay for *Entamoeba histolytica* proteins and the detection of circulating antigens in amebiasis. Gastroenterology 1982;83:1210.
138. Gandhi BM, Irshad M, Achayask SK, Tandon BN. Amebic liver abscess and circulating immune complexes of *Entamoeba histolytica* proteins. Am J Trop Med Hyg 1988;39(5):440.
139. Salata RA, Martínez-Palomo A, Murphy C, Canales L, Segovia E, Treviño R, Ravdin J. Human cell mediated immunity in amebiasis. Proceedings of XI International Congress of Tropical Medicine and Malaria 1984;31
140. Shen LI, Fanger M. Secretory IgA antibodies synergize with IgG in promoting ADCC by human polymorphonuclear cells, monocytes and lymphocytes. Cellular Immunol 1981;59:75.
141. Lloyd S, Soulsby EJJ. The role of IgA immunoglobulins in the passive transfer of protection to *Taenia taeniaeformis* in the mouse. Immunology 1978 34;939.
142. Mouske AJ, Williams JF, Leid RW, Williams CSF. The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis* IV. Immunoglobulins involved in passive transfer of resistance from mother to offspring. Immunology 1975;29;845.
143. Walsh JA, Warren KS. Selective primary health care an interim strategy for disease control in developing countries. N Engl J Med 1979;301:967.
144. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265.
145. Elson CO. Cholera toxin and its subunits as potential oral adjuvants. Current Topics in Microbiology and Immunology, 1989; 146:29.
146. Ortez-Ortez L, Ximénez C, Mendoza F, Michalak C, Melendro EI, Oliva A. *Entamoeba histolytica*: Specific antigen recognized by a monoclonal antibody. Exp Parasitol 1986; 61:390.

147. Saunders GC. The art of solid phase enzyme immunoassay including selected protocols. En: Immunoassays in the clinical laboratory. Nakamura RM, Dito WR, Tucker ES III. Eds. . Alan R. Liss Inc. New York, USA. 1979:99
148. Köhler G, Milstein D. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495.
149. Laemmli JK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 1970;680:1070.
150. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350.
151. Colwell DE, Michaleck SM, McGhee JR. Method for generating a high frequency of hybridomas producing monoclonal IgA antibodies. *Methods in Enzymology* 1986; 121:42.
152. Challacombe SJ, Tomasi TB. Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. *J Exp Med* 1980; 152:1459.
153. Swarbrick ET, Stokes CR, Soothill JF. Absorption of antigens after oral immunization and the simultaneous induction of specific systemic tolerance. *Gut* 1979; 20: 121.
154. Cabré PA, Nash DR, Bazin H, Eyssen H, Heremans MD. Antibodies of the IgA Type in intestinal plasma cells of germfree mice after oral or parenteral immunization with ferritin. *J Exp Med* 1969; 130:723.
155. Klipstein FA, Enfert RF, Clements JD. Arousal of mucosal secretory immunoglobulin A antitoxin in rats immunized with *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Infect Immun* 1982; 37:1086.
156. Svennerholm AM, Hanson LA, Holmgren J, Lindblad BS, Nilsson B, Quereshi F. Different secretory immunoglobulin A antibody responses to cholera vaccination in Swedish and Pakistani women. *Infect and Immunity* 1980; 30:427.
157. Pierce NF, Koster F. Priming and suppression of the intestinal immune response to cholera toxin/toxin by parenteral toxin rats. *J Immunol* 1980; 124:307.
158. Warren HS, Vogel FR, Chedid A. Current status of immunological adjuvants. *Ann Rev Immunol* 1986; 4:369.
159. Leclerc C, Audibert F, Chedid L. Influence of a synthetic adjuvant (MDP) on qualitative and quantitative changes of serum globulins. *Immunology* 1978; 35:963.
160. Morisaki I, Michalek SM, Harmon CC, Torii M, Hamada S, McGhee JR. Effective immunity to dental caries: Enhancement of salivary anti-*Streptococcus mutans* antibody responses with oral adjuvants. *Infection and Immunity* 1983; 40:577.
161. Sugimoto M, Germain RN, Chedid L, Benacerraf B. Enhancement of carrier-specific helper T cell function by the synthetic adjuvant, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP). *J Immunol* 1978; 120:980.
162. Damais C, Parant M, Chedid L, Lefrancier P, Choay J. *In vitro* spleen cell responsiveness to various analogs of MDP (N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) a synthetic immunoadjuvant in MDP high-responder mice. *Cell Immunol* 1978; 35: 173.
163. Iribe H, Koga T. Augmentation of the proliferative response of thymocytes to phytohemagglutinin by muramyl dipeptide. *Cell Immunol* 1984; 88:9.

164. Tanaka A, Nagao S, Kotani S, Shiba T, Kusumoto S. Stimulation of the reticuloendothelial system of mice by muramyl dipeptide. *Infect Immun* 1979;24:302.
165. Lycke N, Holmgren J. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology* 1986;59:301.
166. Elson CO, Ealding W. Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. *J Immunol* 1984;132:2736.
167. Elson CO, Ealding W. Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen. *J Immunol* 1984;133:2892.
168. Lange S, Nygren H, Svennerholm A-M, Holmgren J. Antitoxin cholera immunity in mice: Influence of antigen deposition on antitoxin-containing cells and protective immunity in different parts of the intestine. *Infect Immun* 1980;28:17.
169. Pierce NF, Cray WC. Determinants of the localization magnitude and duration of a specific mucosal IgA plasma cell response in enterically immunized rats. *J Immunol* 1982;128:1311.
170. Holmgren J, Lindholm L. Cholera toxin ganglioside receptors and the immune response. *Immunol Commun* 1976;5:737.
171. Gilbert KM, Hoffmann MK. cAMP is an essential signal in the induction of antibody production by B cell but inhibits helper function of T cell. *J Immunol* 1985;135:2084.
172. Weltzin R, Lucia-Jandris P, Michetti P, Fields BN, Krachenbuhl JP, Neutra MR. Binding and trans epithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: Demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *J Cell Biol* 1989;108:1673.
173. Komisar JL, Fuhrman JA, Cebra JJ. IgA producing hybridomas are readily derived from gut-associated lymphoid tissue. *J Immunol* 1982;128:2376.
174. Komisar JL, Fuhrman JA, Cebra JJ. Characteristics of IgA-secreting hybridomas derived from gut-associated lymphoid tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1983;409:833.
175. Cardoso EJ, Olvera-Soto J, Kumate J, Ortiz B. Purificación parcial de algunos antígenos de superficie de *Entamoeba histolytica*. Investigación de la actividad biológica frente a sueros de pacientes con absceso hepático amibiano. *Arch Invest Med (Méx)* 1982;13 (supl.3):281.
176. Parkhouse M, Cid MA, Calderon J. Identificación de antígenos de membrana de *Entamoeba histolytica* con anticuerpos de pacientes de amibiasis. *Arch Invest Med (Méx)* 1978;9(Supl 1):211.
177. Ximénez C, Sosa O, Leyva O, Morán P, Meléndro EI, Ramiro M. Western blot of *Entamoeba histolytica* antigenic fractions: reactivity analysis with sera from intestinal amoebiasis patients. *Ann Trop Med Parasitol* 1992;86:121.
178. Blakely B, Peter G, Sargeant PG, Reed SL. An immunogenic 30-kDa surface antigen of pathogenic clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 1990;162:949.
179. Leyva O, Rico G, Ramos F, Morán P, Meléndro EI, Ximénez C. Inhibition of adhesion process mediated by anti-*Entamoeba histolytica* specific monoclonal IgA antibodies. *Arch Med Res* 1992;23:227.
180. Ravdin JI, Guerrant RL. Separation of adherence cytotoxic and phagocytic events in the ethiopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med (Méx)* 1982; 13 (Supl13): 123.

BIBLIOGRAFIA GENERADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS

1. Sosa O, Leyva O, Morán P, Melendro EI, Ramiro M, Ximénez C. Reconocimiento antigénico de sueros provenientes de pacientes con amebiasis intestinal aguda. *Revista Mexicana de Parasitología* 1990; 3(1): .
2. Ximénez C, Sosa O, Leyva O, Morán P, Melendro EI, Ramiro M. Western Blot of *Entamoeba Histolytica* antigenic fractions: reactivity analysis with sera from intestinal amoebiasis patients. *Ann Trop Med Parasitol* 1992;86 (2):121.
3. Leyva O, Rico G, Ramos F, Morán P, Melendro EI, Ximénez C. Inhibition of adhesion process mediated by anti-*Entamoeba Histolytica* specific monoclonal IgA antibodies. *Arch Med Res* 1992; 23(2):227.
4. Ximénez C, Leyva O, Morán P, Ramos F, Melendro EI, Ramiro M, Martínez MC, Muñoz O, Kretschmer R, Arellano J. *Entamoeba Histolytica*: antibody response to recent and past invasive events. *Ann Trop Med Parasitol* 1993; 87:1.

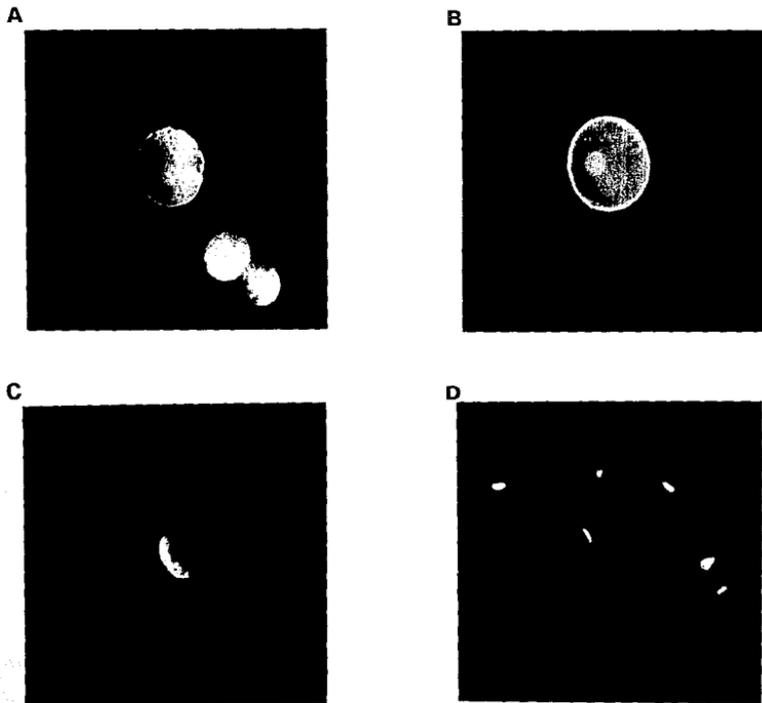


FIGURA 1. Inmunofluorescencia indirecta de trofozoitos de *E. histolytica* HM1:IMSS utilizando anticuerpos monoclonales IgA específicos producidos por las clonas F1P1D4 (A), F1P1D5 (B). La formación de casquetes corresponde a los anticuerpos monoclonales F1P1D4 (C) y F1P1D5 (D).

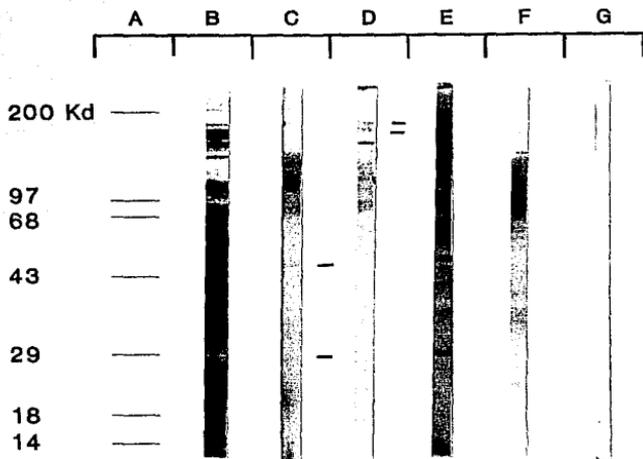


FIGURA 2. Inmunoelectrotransferencia del antígeno de membrana de *E.histolytica* HM1:IMSS revelado con anticuerpos monoclonales IgA específicos: Carril A, Pesos moleculares (Kd); Carril B: Antígeno de *E.histolytica*; Carril C: Anticuerpo monoclonal F1P1D5; Carril D: Anticuerpo monoclonal F1P1D4, Carril E: Suero hiperinmune; Carril F: Control con líquido de ascitis de células de mieloma Sp₂/0-Ag14; Carril G: Anticuerpo anti-IgA de ratón peroxidado.

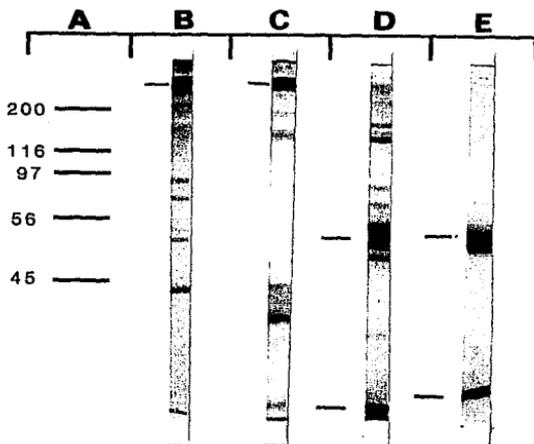


FIGURA 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10%, de un anticuerpo monoclonal IgA purificado (F1P1D5) anti *E.histolytica*. Carril A: Registro de pesos moleculares; Carril B: Anticuerpo monoclonal F1P1D5 (IgA) en condiciones no reductoras; Carril C: Anticuerpo monoclonal TEPC-15 en condiciones no reductoras; Carril D: Anticuerpo monoclonal F1P1D5 en condiciones reductoras; Carril E: Anticuerpo monoclonal TEPC-15 en condiciones reductoras.