

11261
68
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANTICUERPO
MONOCLONAL DE RATÓN DIRIGIDO CONTRA GLICOPROTEINAS
DE MEMBRANA EXTERNA DE *Entamoeba histolytica* ASI COMO SU
IDIOTIPO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS.
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA
P R E S E N T A :
ADRIANA KARINA CHAVEZ RUEDA

ASESORES: DR. FRANCISCO BLANCO FAVELA
QFB CONCEPCION AGUNDIS MATA

CIUDAD UNIVERSITARIA,

1998

257925

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio nueve del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UNAM, en el Departamento de Investigación en Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, SSA y en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría, CMN Siglo “XXI”, IMSS. Bajo la dirección del Dr. Francisco Blanco Favela y la QFB. Concepción Agundis Mata. Esta investigación fue financiada por CONACYT (0706P-M9506). Durante el desarrollo de esta Tesis la sustentante fue Becaria del Instituto Mexicano del Seguro Social y de CONACYT.

Agradezco la colaboración de los Drs. Edgar Zenteno Galindo y Víctor Tsutsumi de la Facultad de Medicina, UNAM y del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN respectivamente.

A MIS PADRES Y HERMANOS:

POR SU AMOR, PRESENCIA, APOYO Y
DEDICACIÓN, QUE ME HAN OTORGADO.

A MI ASESOR:

DR. FRANCISCO BLANCO FAVELA
POR OFRECERME ESTA TESIS Y
BRINDARME SU AMISTAD, AYUDA
Y CONOCIMIENTOS.

A LA DRA. CONCEPCION AGUNDIS:

GRACIAS A SU AYUDA, AMISTAD,
DISPOSICIÓN Y CONSEJOS PUDE
ÁLCANZAR ESTA META.

AL DR. EDGAR ZENTENO:

POR RECIBIRME EN SU LABORATORIO
Y APOYARME EN TODO MOMENTO.

A MIS AMIGOS:

POR SU AMISTAD
DESINTERESADA.

A TODO EL PERSONAL DEL LABORATORIO
NUEVE DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM Y
DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DEL
INER, SSA. POR BRINDARME SU AMISTAD Y
APOYO INCONDICIONAL.

INDICE.

Resumen	1
Introducción	3
Justificación	13
Objetivo General	14
Objetivos Particulares	14
Esquema General de Trabajo	15
Material y Métodos	16
Resultados	27
Discusión	46
Conclusiones	54
Bibliografía	55

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

	PAGINA
Fig. 1 Corte histológico del absceso hepático amibiano.	6
Fig. 2 Redes idiotípicas.	12
Fig. 3 Patrón electroforético de extracto de glicoproteínas de <i>E. histolytica</i> .	28
Fig. 4 Esquema de clonación para la selección del anticuerpo monoclonal.	29
Fig. 5 Reconocimiento de la glicoproteína de 66 kDa por el anticuerpo monoclonal (4°C ₇).	30
Fig. 6 Porciento de unión del anticuerpo monoclonal con el antígeno tratado con tripsina.	31
Fig. 7 Porciento de unión del anticuerpo monoclonal con el antígeno tratado con metaperyodato de sodio.	32
Fig. 8 Inhibición de la interacción antígeno anticuerpo monoclonal empleando Carbohidratos.	33
Fig. 9 Inmunofluorescencia de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> utilizando el anticuerpo monoclonal.	34
Fig. 10 DOT-ELISA de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> empleando el anticuerpo Monoclonal.	35
Fig. 11 Inmunoelectrotransferencia del extracto de glicoproteínas de <i>E. histolytica</i> .	36
Fig. 12 Fagocitosis de eritrocitos humanos por trofozoitos de <i>E. histolytica</i> .	37

Fig. 13	Inhibición de la fagocitosis por el anticuerpo monoclonal 4°C ₇ .	38
Fig. 14	Reconocimiento del anticuerpo anti - idiotipo por su antígeno.	39
Fig. 15	Inhibición de la interacción idiotipo (anticuerpo monoclonal)-anticuerpo anti - Id.	40
Fig. 16	Expresión del idiotipo en el anticuerpo monoclonal.	41
Fig. 17	Porcentaje de unión del idiotipo (anticuerpo monoclonal) al anticuerpo anti - Id.	42
Fig. 18	Reconocimiento del extracto de glicoproteínas de <i>E. histolytica</i> por el anticuerpo Ab3.	43
Fig. 19	Reconocimiento de la glicoproteína de 66 kDa por el anticuerpo Ab3.	43
Tabla 1	Media y desviación estándar de los distintos grupos de trabajo.	44
Fig. 20	Densidad óptica de sueros utilizando al anticuerpo anti - Id como antígeno	45

ABREVIATURAS.

<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica.</i>
AHA	Absceso hepático amibiano.
kDa	Kilodaltones.
cDNA	Acido deoxirribonucleico.
ELISA	Inmunoensayo enzimático en fase sólida.
Id	Idiotipo.
Ab 1	Anticuerpo monoclonal.
Ab 2	Anticuerpo anti – idiotipo.
Ab 3	Anticuerpo anti – anti idiotipo.
PBS	Amortiguador de fosfatos salino.
SFB	Suero fetal de bovino.
PHMB	Parahidroximercuribenzoato.
ACF	Adyuvante completo de Freund.
PEG	Polietilenglicol.
Ig	Inmunoglobulina.
OPD	Orto-fenilendiamina
IET	Inmunolectrotransferencia.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
GNR	Gammaglobulina normal de ratón.
GNC	Gammaglobulina normal de conejo.

RESUMEN.

La amibiasis se considera de las principales parasitosis en el humano, que afecta alrededor del 10 % de la población mundial. En México se considera un importante problema en salud pública, por lo que resulta de interés toda investigación que produzca un mejor conocimiento en la enfermedad, tanto para lograr mejores métodos diagnósticos, como procedimientos terapéuticos y medidas inmunoproliféricas eficaces como el desarrollo de vacunas.

El estudio de los antígenos reconocidos durante la infección ha sido importante para el conocimiento de la enfermedad, el desarrollo de métodos diagnósticos y el desarrollo de vacunas contra la amibiasis. Por lo anterior, se procedió a la obtención de un anticuerpo monoclonal dirigido contra una glicoproteína de *Entamoeba histolytica* con peso molecular de 66 kDa. Con la ayuda del anticuerpo monoclonal 4^cC₇ se pudo caracterizar parcialmente esta glicoproteína la cual se encuentra expresada en la superficie del trofozoito, esto se determinó mediante el empleo de una inmunofluorescencia y DOT-ELISA, al someterla a un tratamiento con tripsina y metaperiodato de sodio se determinó que el anticuerpo monoclonal reconoce la porción proteica en un 64.7 % y la porción oligosacárida en un 36.3 % de la misma. Se realizaron ensayos de inhibición de la unión del antígeno con el anticuerpo utilizando diferentes monosacáridos, se encontró que la glucosamina inhibe en un 30 %, esto sugiere que el antígeno de 66 kDa presentan en su estructura este monosacárido. Mediante ensayos de inhibición de la fagocitosis con el anticuerpo monoclonal, se encontró que este podía inhibir el proceso de fagocitosis en un 26 %, por lo que esta glicoproteína de 66 kDa tiene importancia en este proceso.

Teniendo en cuenta los problemas que existen para purificar y mantener los antígenos amibianos debido a la gran cantidad de proteasas que presenta la amiba, se decidió obtener la imagen interna de la glicoproteína de 66 kDa mediante el empleo de anticuerpos anti - idiotipo (Ab2), por lo que se inmunizó a un conejo con la porción Fab del anticuerpo monoclonal (Ab1) para la obtención del anticuerpo anti - idiotipo. Mediante el empleo de una

inmunoelectrotransferencia se mostró que el idiotipo que reconoce el anticuerpo anti - idiotipo se encuentra expresado en la cadena pesada del anticuerpo monoclonal, se determinó que el anticuerpo anti-idiotipo era un anticuerpo Ab2 β , ya que al preincubar al anticuerpo monoclonal con el antígeno y probarlo con el anticuerpo anti-idiotipo el porcentaje de unión del anticuerpo monoclonal con el anti-idiotipo disminuyó en un 50 %, además que para comprobar esto se inmunizó un conejo con el anticuerpo Ab2 obteniendo así un anticuerpo Ab3 el cual fue capaz de reconocer a la glicoproteína de 66 kDa comprobando que el anticuerpo anti-idiotipo es un Ab2 β que expresa la imagen interna de la glicoproteína de 66 kDa. Al utilizar como antígeno la imagen interna de la glicoproteína de 66 kDa y tomando como punto de corte una densidad óptica de 0.233 podemos diferenciar los sueros de absceso hepático amibiano, de los de portadores asintomáticos, infectados con otros parásitos y controles negativos, con una sensibilidad del 91.9 % y una especificidad del 88.3%. Por lo que hace al anticuerpo anti-idiotipo un buen candidato para el diagnóstico del absceso hepático amibiano.

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es un protozoo anaerobio perteneciente al Subphylum *Sarcomastigophora*, Superclase *Sarcodina*, Clase *Rhizopodea*, Orden *Amoebida* y Familia *Endamoebidae*. Es la única especie del género *Entamoeba* patógena para el hombre. En comparación al de otros parásitos su ciclo vital es relativamente simple. En la forma vegetativa, el trofozoito se aloja en el intestino, se reproduce por fisión binaria produciendo bajo condiciones apropiadas un quiste mononucleado que tras dos divisiones nucleares sucesivas forma un quiste tetranucleado típico, éste da lugar a un metaquiste que por división puede originar ocho trofozoitos uninucleados. La transmisión a un nuevo huésped se realiza a través de la ingestión de quistes en agua o alimentos contaminados (1).

Los trofozoitos pueden ser identificados en evacuaciones recientes, sin necesidad de una tinción, gracias a su típica locomoción progresiva, la presencia de pseudópodos muestran marcada delimitación entre el ectoplasma y el endoplasma. El núcleo suele ser invisible en solución salina, cuando se colorea se observa una delicada membrana nuclear, finos gránulos de cromatina sobre la superficie interna dispuestos en unidades discretas y un pequeño cariosoma, localizado generalmente en posición central; el tamaño del trofozoito puede variar de unos 8 a 30 μm de diámetro, es frágil y sensible a la temperatura. La membrana plasmática del trofozoito es una cubierta celular apenas detectable al microscopio siendo similar a la de otras células eucariotes. El citoplasma contiene diferentes organelos: cuerpos densos, ribosomas, polisomas, cuerpos helicoidales y tubulares, numerosas vacuolas mayores a 2 μm , vesículas menores de 2 μm . El trofozoito carece de mitocondrias y aparato de Golgi, su retículo endoplásmico consta de vesículas finas rodeadas de algunos ribosomas (1-3).

Los quistes de *E. histolytica* son esféricos aunque en ocasiones se pueden observar ovalados de un tamaño promedio de 12 μm , con una pared de 125 a 150 nm de grosor. Su membrana plasmática frecuentemente presenta profundas invaginaciones y en su citoplasma se observan polirribosomas, vacuolas y depósitos de glucógeno. Además, presentan de 1 a 4 núcleos que al

igual que en los trofozoitos en solución salina son invisibles pero visibles con técnicas adecuadas. (1, 3).

La amibiasis como infección o infestación se define como la condición de hospedar *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas, las características tanto del hospedero, como del parásito y del medio ambiente son factores que contribuyen a la variación clínica de la enfermedad (4). Su distribución es cosmopolita y la incidencia varía de una región a otra, siendo mayor en zonas tropicales, subtropicales y en ciudades con condiciones sanitarias deficientes donde prevalece la pobreza, la sobrepoblación y la ignorancia (5). La amibiasis se considera una de las principales parasitosis en el humano, que afecta alrededor del 10 % de la población mundial (6). Aproximadamente el 90 % de las personas infectadas son portadores asintomáticos, solamente el 10 % desarrollan manifestaciones clínicas como disentería o amibiasis invasiva (7), la amibiasis causa alrededor de 40 000 muertes anuales ocupando el tercer lugar de muertes causadas por parasitosis (después de la malaria y la esquistosomiasis) (8,9). En México la amibiasis se ha identificado como una enfermedad endémica que se extiende por todo el país independientemente de los factores geográficos o del clima, lo que la hace un importante problema en salud pública (4). En promedio el 5.95 % de los mexicanos tienen anticuerpos séricos dirigidos contra *E. histolytica*. Esta frecuencia varía entre el 2.53 % y el 9.95 % según su distribución geográfica. La amibiasis ocupa el cuarto lugar en frecuencia entre las enfermedades transmisibles, con una tasa de casi el 1 % y aumenta constantemente. En 1970 la amibiasis ocupó el cuarto lugar como causa de muerte en el Hospital General de la Secretaría de Salubridad y Asistencia y su frecuencia fluctuó entre el 4.7 y 5.7 % dato obtenido a través de autopsias practicadas en los principales hospitales generales de la Ciudad de México (6). En África la amibiasis tiene una prevalencia del 10 %, del cual el 0.1 % termina con amibiasis invasiva cada año, mientras que en Estados Unidos la prevalencia de esta enfermedad es del 4 % (8).

Los cuadros clínicos que resultan de la infección con *E. histolytica*, incluyen la infección intestinal asintomática, la colitis invasiva aguda o crónica, el absceso hepático amibiano (AHA) y en muy pocas ocasiones ameboma o invasión a otros órganos o tejidos. En la infección intestinal las manifestaciones clínicas son; diarrea con moco y sangre, dolor

abdominal y fiebre. La lesión histopatológica del colon se caracteriza por: ulceración de la mucosa, que puede extenderse a los tejidos subyacentes e incluso producir perforación de la pared intestinal, edema y extravasación focal subepitelial de eritrocitos. Es común encontrar un número variable de linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y polimorfonucleados; la superficie del epitelio se encuentra infiltrada localmente con eritrocitos y células inflamatorias, a menudo con microulceraciones en el epitelio y ulceraciones de mayor tamaño (6,7). El ameboma en contraste, es una tumoración inflamatoria, se localiza con mayor frecuencia en el ciego, son complicaciones raras, pero serias ya que se pueden confundir con tumoraciones, el principal criterio para el diagnóstico es la presencia de *E. histolytica* en las lesiones (9).

El absceso hepático ocurre en aproximadamente el 2 % de los pacientes adultos infectados con *E. histolytica* en áreas endémicas, sin embargo se ha diagnosticado hasta en el 4 % de la población infectada cuando existen epidemias (es 10 veces más frecuente en adultos que en niños). Los eventos morfológicos durante el absceso hepático han sido estudiados experimentalmente en hámster; en las primeras 12 horas se observa una infiltración celular aguda, compuesta por un gran número de leucocitos polimorfonucleados que se incrementan en función del tiempo transcurrido, a partir de la inoculación, los hepatocitos cercanos a las lesiones primarias muestran cambios degenerativos que terminan en necrosis (Figura 1). En los últimos estadios se incrementa la extensión de la necrosis, los macrófagos y las células epiteloideas reemplazan a la mayoría de los leucocitos, a los siete días se presenta una necrosis extensiva asociada con la fusión de los granulomas (2,6,8).

Los estudios realizados para explicar las diferentes manifestaciones clínicas de la amebiasis han concluido en la existencia de cepas de *E. histolytica* patógenas y no patógenas (*E. dispar*) indistinguibles morfológicamente, pero distinguibles utilizando un patrón de isoenzimas (zimodemos) comprobado por Sargeant y col., quienes lograron diferenciar cepas en un patrón electroforético resultando cuatro isoenzimas específicas (10). Este patrón es diferente para cepas aisladas tanto de pacientes con manifestaciones clínicas como de pacientes asintomáticos. Se han establecido 23 diferentes zimodemos, de los cuales solamente 10 se han asociado con la amebiasis invasiva (11-13).

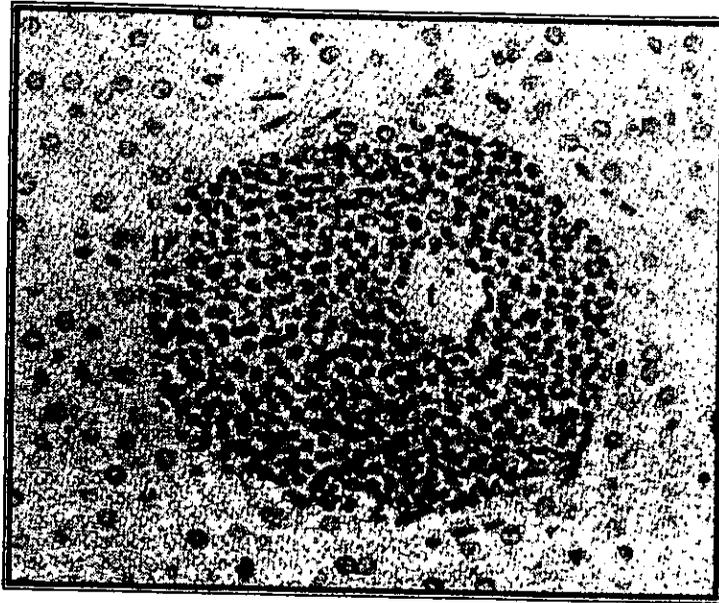


Figura 1. Corte histológico del absceso hepático amibiano. En las primeras 12 horas del absceso hepático amibiano, en hámster, se observa un aumento en la infiltración celular, compuesta por un gran número de leucocitos polimorfonucleados (p) que se incrementan en función del tiempo. En la figura se observa en la parte central un trofozoito (t) rodeado por un gran número de neutrófilos.

Las principales características de las cepas patógenas de *E. histolytica* son: capacidad para producir absceso hepático por inoculación en hámster, son aglutinadas en presencia de Concanavalina A, avidez de fagocitar bacterias, perlas de poliestireno y eritrocitos; esta fagocitosis se realiza con mayor velocidad y cantidad que las cepas no patógenas. La eritrofagocitosis se ha considerado tradicionalmente como uno de los principales criterios para identificar los trofozoitos patógenos de *E. histolytica* (14-16).

La fisiopatología de la amibiasis como se mencionó, se caracteriza por daño masivo al tejido del huésped, como resultado de la fuerte actividad lítica de la amiba; el proceso citolítico de *E. histolytica* en cultivos celulares, se ha dividido en cuatro pasos: 1) adhesión, 2) citolisis

seguida del contacto celular, 3) fagocitosis y 4) degradación intracelular. Las membranas plasmáticas del trofozoito y de la célula blanco tienen un contacto íntimo pero transitorio, el cual es mediado por adhesinas, al estar en contacto la amiba libera factores citopáticos que inducen la pérdida del potencial de membrana conduciendo a la célula blanco a un estado prelítico. Finalmente, el trofozoito fagocita total o parcialmente la célula afectada liberando enzimas proteolíticas que terminan por lisar a las células. (2,8,17).

Para estudiar la participación del sistema inmune en respuesta a la amibiasis, ha sido necesario definir los antígenos de *E. histolytica* que son reconocidos durante la infección. Uno de los problemas más importantes en este aspecto ha sido la producción y caracterización de estos antígenos. Estudios realizados con antígenos amibianos provenientes de cultivos no axénicos no pudieron ser interpretados, debido a la presencia de contaminantes como bacterias u otros parásitos (18,19). A partir de 1961, con la aparición de cultivos axénicos para *E. histolytica* descrito por Diamond (20), las primeras preparaciones y estandarizaciones de antígenos amibianos provenientes de este tipo de cultivo (21), permitieron la obtención de un material antigénico heterogéneo que recibió el nombre de histolicina. Posteriormente se han venido describiendo diferentes antígenos entre los cuales se encuentran antígenos de superficie (proteínas, carbohidratos y lípidos), antígenos presentes en citoplasma y exoantígenos. Algunos estudios han reportado la asociación entre antígenos amibianos y la respuesta inmune.

Los antígenos de superficie de trofozoitos de *E. histolytica*, son los primeros en ser reconocidos por el sistema inmune. La importancia de estos antígenos ha sido demostrada por la inmovilización de los trofozoitos intactos con suero inmune proveniente de pacientes con absceso hepático amibiano (22,23), utilizando la reacción específica de anticuerpos anti-amiba total y anti-lipopeptidofosfoglicana revelada por inmunofluorescencia (24,25) así como la lisis de los trofozoitos a través de la vía clásica y alterna del complemento (26,27)

La utilización de diferentes metodologías basadas en el uso de distintos inhibidores de proteasas, en la obtención de antígenos amibianos no ha permitido obtener antígenos de una manera estándar y comparables entre una extracción y otra. Mas aún, existe diversidad entre

los antígenos descritos por un grupo y otro, ya que dependiendo del método utilizado se obtienen diferentes patrones antigénicos amibianos (28). Esto, ha permitido estudiar diferentes antígenos amibianos, algunos participan en la citopatogenicidad de *E. histolytica*, por ejemplo, la proteína de superficie con un peso molecular de 37 kDa, tiene la propiedad de unir fibronectina, siendo este un mecanismo para que el trofozoito pueda destruir la matriz extracelular y comience la invasión a otros órganos (29). Otro antígeno importante descrito en *E. histolytica*, es una proteína tiol cisteína, proteinasa soluble de 56 kDa, con un probable papel en el proceso de la invasión a tejido; *in vitro* esta enzima tiene la capacidad de degradar colágena, fibronectina y laminina; la proteinasa es producida principalmente por cepas patógenas y en menor cantidad por no patógenas (11,30).

Se sabe que para que el parásito invada otros órganos es necesario un contacto directo entre la amiba y la célula blanco, unión mediada por adhesinas. Se han reportado diferentes antígenos que intervienen en el proceso de adhesión. Orozco y col describieron una proteína de 112 kDa; que participa en los fenómenos de adhesión, fagocitosis y efecto citopático; se encuentra en la membrana plasmática así como en membranas vacuolares, se localiza tanto en trofozoitos virulentos como en los avirulentos (31). Sin embargo, la adhesina de 112 kDa se encuentra modificada en las mutantes avirulentas. Al incubar la proteína de 112 kDa en dietilamino se obtienen dos péptidos de 50 y 70 kDa, solamente el de 70 kDa junto con la proteína de 112 kDa tienen actividad de proteasa, comprobada por su capacidad de degradar gelatina (31,32).

Las glicoproteínas de membrana se encuentran involucradas en diferentes actividades biológicas de las células, entre otras la adhesión (33). Se ha observado que la unión entre *E. histolytica* y las células epiteliales es mediada por la adhesión entre lectinas. Al adicionar a cultivos galactosa y N-acetilgalactosamina (Gal y GalNAc) en una concentración de 50 mM, se inhibió 90 % la adhesión de *E. histolytica* a su célula blanco, las células con deficiencias en la producción de oligosacáridos mostraron resistencia a la adhesión (34). Esta lectina se encuentra en la membrana del trofozoito tiene un peso molecular de 260 kDa y es un heterodímero compuesto por dos glicoproteínas de 170 y 35 kDa unidas por puentes disulfuro. La subunidad de 170 kDa es un antígeno altamente conservado (35) con una región rica en cisteínas; esta proteína comparte un epítipo con las subfamilia de las integrinas beta 2, las

cuales se expresan exclusivamente en leucocitos, lo que pudiera explicar la capacidad de los trofozoítos para unirse e invadir las células epiteliales (36,37); también se ha propuesto un posible papel en la resistencia a la lisis por complemento (38). Otra lectina reportada es la de 220 kDa, se encuentra en la superficie en *E. histolytica*, es inhibida por oligosacáridos de N – acetilglucosamina a concentraciones micromolares, los anticuerpos dirigidos contra esta lectina inhiben la fagocitosis de eritrocitos del grupo B en un 54 % (39,40). Otra adhesina que se ha estudiado es la de 66 kDa la cual participa tanto en la fagocitosis como en el efecto citopático (41).

En la membrana plasmática de *E. histolytica* se encuentra una proteína de 29 kDa rica en cisteínas, presente solo en cepas patógenas, al poner en contacto esta proteína con linfocitos de pacientes con AHA induce la proliferación de estos. A través de la obtención del cDNA y secuenciación de esta proteína de 29 kDa, se observó que comparte dominios con proteínas de procariontes (*Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium*) que podrían estar implicadas en la inactivación del peróxido de hidrogeno (42-44), también se observó que esta proteína es importante en el proceso de adhesión y citotoxicidad de la amiba hacia la célula blanco, además, es reconocida por pacientes con absceso hepático y en menor grado por portadores asintomáticos (45).

En estudios serológicos al usar antígenos puros o mezcla de ellos, han demostrado la presencia de anticuerpos dirigidos contra *E. histolytica* en pacientes con amibiasis invasiva. Agundis y col, identificaron una glicoproteína de membrana (Gm) de *E. histolytica*, capaz de ser reconocida por el 87% de 91 sueros de pacientes con AHA, no fue reconocido por los sueros de personas sanas, se encontró una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100%, demostrando que esta Gm tiene relevancia en la respuesta inmune a esta enfermedad (46). Esta Gm tiene un peso molecular de 35 kDa (46,47). Además, se ha reportado la presencia de otro antígeno de superficie (una proteína de 96 kDa) que es reconocido por sueros de pacientes con AHA (48).

La obtención de anticuerpos monoclonales ha ayudado en la búsqueda de antígenos relevantes en la respuesta inmune a este protozoario, así, como su posible utilización en un método de

diagnóstico. Se han descrito algunos anticuerpos monoclonales contra componentes de membrana plasmática de *E. histolytica* obtenidos a partir de la inoculación de trofozoítos íntegros. Ravdin y col. reportaron un anticuerpo monoclonal capaz de inhibir la adherencia *in vitro* de *E. histolytica* en células de ovario de hámster (49). Vohra y col. obtuvieron un anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno de superficie de 66 kDa capaz de disminuir la adherencia y la fagocitosis de eritrocitos (42). El anticuerpo monoclonal reportado por Mann y col. fue capaz de reconocer una proteína de adhesión de 170 kDa (32). Agundis y col. reportaron un anticuerpo monoclonal IgM con cadena ligera kappa, que reconoce una glicoproteína de membrana plasmática de 35 kDa específicamente su porción oligosacárida, lo cual se comprobó al quitar la porción oligosacárida con metaperiodato de sodio, ocasionando la pérdida de la interacción entre la glicoproteína y el anticuerpo (46,47). El anticuerpo monoclonal reportado por Bracha reconoce un antígeno de superficie de 30 kDa en cepas no patógenas, el cual permite diferenciar entre cepas patógenas y no patógenas (50). Para el diagnóstico de la enfermedad, se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido contra una proteína citoplasmática de *E. histolytica* con un peso molecular de 84 kDa, éste se utilizó en ELISA para la detección de antígenos amibianos en materia fecal, pero solamente pudo diferenciar entre portadores y enfermos, siempre y cuando no se utilizara en un área endémica (51). Estos anticuerpos monoclonales también se han utilizado para observar la presencia de los trofozoítos de *E. histolytica* en hígado de hámster, así como los cambios histopatológicos que se presentan en éstos (52).

El estudio de los antígenos amibianos relevantes en la respuesta inmune se han realizado a través de la producción de anticuerpos monoclonales o de la purificación de estos antígenos, un inconveniente de esto último, es la presencia de una gran cantidad de proteasas en la amiba, que degradan los antígenos aún en presencia de inhibidores de proteasas. Por lo que nuestra propuesta fue estudiar un antígeno amibiano a través de la interacción del idiotipo (Id) con el anticuerpo anti – idiotipo (que presente la imagen interna del antígeno). La interacción entre el idiotipo y el anticuerpo anti-idiotipo se ha empleado en investigaciones de infecciones bacterianas, virales y parasitarias como: tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas, malaria y esquistosomiasis.

Jerne define al sistema inmune como una red de interacciones entre idiotipos los cuales se encuentran formados por los idiotopos (determinantes antigénicos), los idiotipos se encuentran localizados en la región variable de los anticuerpos. Un anticuerpo (Ab1) puede ser reconocido por uno o varios anticuerpos anti-idiotipos (Ab2), y este a su vez por otro anticuerpo anti-anti-idiotipo (Ab3) (53). En la actualidad se acepta que existen diferentes clases de idiotipos y son los siguientes:

Idiotipos públicos.- Son idiotipos compartidos por varios anticuerpos dirigidos contra un mismo determinante antigénico.

Idiotipos privados.- Estos idiotipos se encuentran expresados en algunos anticuerpos dirigidos contra un mismo determinante antigénico.

La imagen interna del antígeno se puede lograr mediante la inoculación de animales con el anticuerpo Ab1 para obtener el Ab2, inocular más animales con el Ab2 para obtener el Ab3. Se ha observado que algunos Ab3 reaccionan con el mismo antígeno reconocido por el anticuerpo Ab1, esto es, para cada epitopo de un antígeno extraño existe un Ab2 que expresa la imagen y por tanto la inmunización con el anticuerpo anti-idiotipo (Ab2) genera la producción de anticuerpo Ab3 que sería igual al Ab1. En base a lo anterior los anticuerpos Ab2 se han clasificado en:

Ab2 α .- Son aquellos que se encuentran dirigidos contra idiotopos asociados con el "framework" (idiotipos que se encuentran fuera del paratopo), la reacción del Ab1 al Ab2 no es inhibida por el antígeno.

Ab2 β .- Son aquellos cuyo idiotipo es la imagen interna del antígeno, por lo que puede conferir inmunidad en diferentes especies; la reacción de este Ab2 al Ab1 se inhibe por el antígeno.

Ab2 γ .- Reconocen un idiotipo muy cercano al sitio de combinación del Ab1 pero no son imágenes internas; pueden inhibir la unión del Ab1 a su antígeno y pueden ser inductores de un respuesta Ab1 (54).

Esto se puede observar esquemáticamente en la figura. 2.

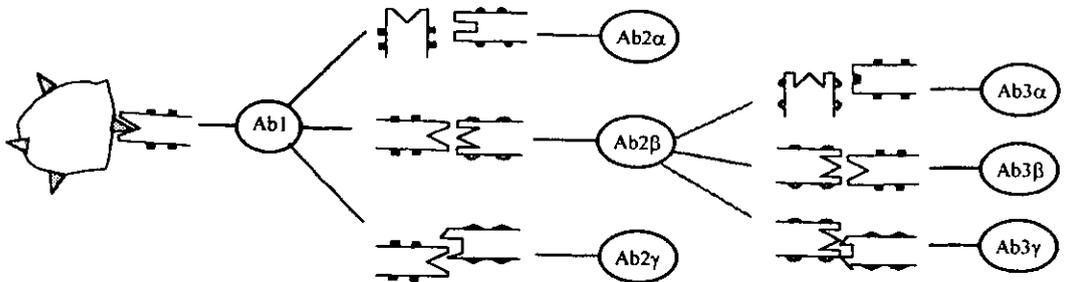


Figura 2. Redes idiotípicas. La presencia de un inmunógeno induce una respuesta inmune, caracterizada por la producción de anticuerpos Ab1. El anticuerpo Ab1 puede inducir una respuesta con la producción de anticuerpos anti - idiotipos (Ab2), el cual puede ser de tres tipos: Ab2 α , reconocen los idiotipos asociados con el "framework", los Ab β cuyo idiotipo es la imagen interna del antígeno y los Ab2 γ reconocen un sitio muy cercano al paratopo pero no es la imagen interna. Los anticuerpos Ab2 también pueden inducir la producción de anticuerpos Ab3, que al igual que los Ab2 pueden reconocer tres regiones. Los anticuerpos Ab3 β inducidos por un Ab2 β , son iguales que los Ab1.

Debido a que los anticuerpos anti-idiotipo pueden presentar la imagen interna del epitopo que reconoce al anticuerpo Ab1, es posible utilizarlos para la producción de vacunas, sobre todo cuando los microorganismos son difíciles de cultivar, de obtener cantidades suficientes de antígenos o que presenten poca inmunogenicidad como los carbohidratos. Algunas vacunas que se han hecho en el ámbito experimental son: la vacuna contra *Neisseria gonorrhoeae* (55), *Candida albicans* (56), *Hemophilus influenzae* (57), células de carcinomas (58), *Trypanosoma cruzi* (59) y *Schistosoma mansoni*, en este último se han hecho diferentes estudios y se ha obtenido una protección en ratas del 50 - 80 % (60). Otra área de interés de estos anticuerpos anti - idiotipo es utilizarlos en el diagnóstico clínico tal es el caso de *Schistosoma japonicum* (61) y de cisticercosis (62). Estas han sido algunas aplicaciones que se le han dado a los anticuerpos anti - idiotipo en el estudio de las diferentes enfermedades.

JUSTIFICACIÓN

La amibiasis es un grave problema de salud en diversas regiones del mundo, debido a su alta frecuencia y su evidente repercusión social, resulta de especial interés toda investigación dirigida a un mejor conocimiento de la enfermedad, tanto en el ámbito de métodos diagnósticos, como de procedimientos terapéuticos y/o medidas inmunoprolácticas eficaces como el desarrollo de vacunas.

Los cuadros clínicos que resultan de la infección con *E. histolytica*, incluyen; la infección intestinal asintomática, la colitis invasiva aguda o crónica, el ameboma y el absceso hepático amibiano (AHA). El diagnóstico suele ser clínico. Sin embargo en ocasiones es necesario el empleo de pruebas de gabinete y laboratorio a fin de corroborar el diagnóstico. Uno de los mayores problemas en el estudio de la amibiasis desde el punto de vista de la respuesta inmune ha sido la obtención y caracterización de los antígenos relevantes ya que la amiba contiene una gran cantidad de proteasas que ocasiona que sus antígenos sean degradados rápidamente, además que el rendimiento en la obtención de antígenos sea muy bajo. Lo anterior se puede resolver mediante el empleo de biología molecular o de las redes idiotípicas. Así, el propósito del presente trabajo fue obtener un anticuerpo monoclonal (Ab1) capaz de reconocer un antígeno de membrana de *E. histolytica* relevante en la respuesta inmune en humanos, producir su anticuerpo anti idiotipo (Ab2), con la imagen interna del antígeno y determinar la capacidad del anticuerpo Ab2 para diferenciar entre los distintos cuadros clínicos de la enfermedad, a fin de utilizarlo como un posible método diagnóstico.

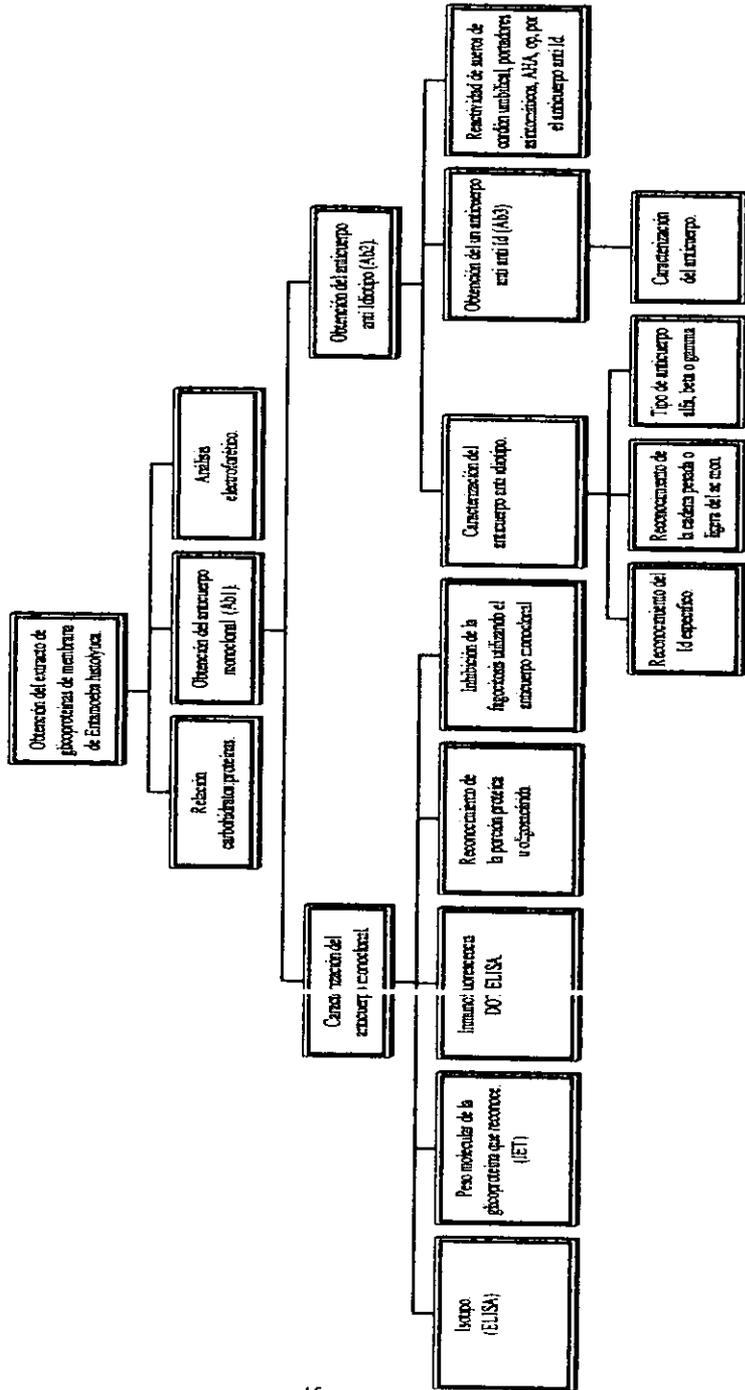
OBJETIVO GENERAL.

Encontrar diferencias en la expresión idiotípica de los anticuerpos séricos de los pacientes con distintos cuadros clínicos de la amibiasis, utilizando un anticuerpo anti - idiotipo que exprese la imagen interna de una glicoproteína de membrana externa de *Entamoeba histolytica*, relevante en la respuesta inmune del huésped

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Obtener y caracterizar un anticuerpo monoclonal de ratón, dirigido contra una glicoproteína de membrana externa de *Entamoeba histolytica*.
2. Determinar la importancia de la glicoproteína de membrana reconocida por el anticuerpo monoclonal.
3. Obtener y caracterizar un anticuerpo anti idiotipo, a partir del anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra *Entamoeba histolytica*.
4. Evaluar la capacidad del anticuerpo anti idiotipo de ser reconocido por sueros de: cordón umbilical, portadores asintomáticos, absceso hepático amibiano e infectados con otros parásitos.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.



MATERIAL Y MÉTODOS

AMIBAS: Se utilizaron amibas de la cepa HM1:IMSS, donadas por el Dr. V. Tsutsumi del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) las cuales se cultivaron a 36°C, en medio TYI-S-33 pH 6.8 complementado con vitaminas y suero bovino de adulto (Biofluids) al 20 % según el método de Diamond y cols. (20).

EXTRACCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS DE MEMBRANA: Se utilizaron trofozoítos de cultivo axénico cosechado en fase logarítmica, para su concentración se centrifugaron a 1200 r.p.m./10 min. a 4°C desechándose el sobrenadante y conservando el paquete celular, este se lavó por dos ocasiones con PBS (amortiguador de fosfatos 0.1 M, cloruro de sodio 0.15 M) pH 7.2, el botón se resuspendió en una solución de Tris 150 mM, pHMB (parahidroximercuribenzoato) 10 mM, pH 9; los trofozoítos se rompieron en forma mecánica con un homogeneizador de cristal (Eberbach) (28), se centrifugaron a 13000 r.p.m./30 min., el sobrenadante (componente soluble) se almacenó a -70°C. Para la extracción de las glicoproteínas (47), el botón conteniendo a las membranas, se resuspendió en amortiguador de acetato de sodio 10 mM, Tris-base 50 mM, KCl 50 mM, por 24 h a 4°C, se centrifugaron a 13000 r.p.m./10 min., se realizaron 3 extracciones de membranas con el mismo regulador. El sobrenadante se almacenó a -70°C, la determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (62).

ANTICUERPOS MONOCLONALES (Ab 1)

Inmunización: Se inocularon ratones de la cepa Balb/c con 70 µg de glicoproteínas de membrana de amibas, en Adyuvante Completo de Freund (ACF) por vía intraperitoneal en el tiempo cero. Posteriormente, se inocularon con 50 µg en ACF por la misma vía cada 7 días durante 4 semanas. Tres días después de la última dosis se sangraron los ratones del plexo

retroorbital separando el suero, donde se midieron los anticuerpos dirigidos contra el extracto de amiba por el método de inmunoensayo enzimático (ELISA).

Fusión celular: La fusión celular se realizó de acuerdo al método de Köller y Milstein (64). Se utilizó el bazo de ratón Balb/c previamente inmunizado con las glicoproteínas de membrana de *E. histolytica*. Los linfocitos se separaron del tejido conectivo, se colocaron en medio de cultivo DMEM (Sigma Chemical Co.), se lavaron y contaron. Para la fusión se mezclaron los linfocitos y células de mieloma P3-X63-Ag8 en una relación de 5:1 (linfocitos:mieloma) en un tubo de 50 ml, se centrifugaron a 1200 r.p.m./10 min. a 37° C, desechándose el sobrenadante, las células se disgregaron suavemente y se adicionó 100 µl de Polietilenglicol 4000 (PEG [Gibco]) por cada 10 millones de células, posteriormente se agitó el tubo muy suavemente durante 45 s, el PEG se diluyó con 10 ml de medio el cual se eliminó después de centrifugar. Las células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM suplementado al 20 % con suero fetal de bovino (SFB [SIGMA]) en el volumen exacto para tener 50,000 cél / pozo, las cuales se distribuyeron en microplacas de cultivo de 96 pozos (Nunc) y se incubaron a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Al tercer día de haber realizado la fusión se agregó medio con HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) el cambio de medio se realizó cada tercer día durante 14 días, esto con la finalidad de seleccionar las células que se fusionaron; después de este tiempo se agregó medio con HT (hipoxantina, timidina) por 8 días y finalmente medio DMEM al 20 %. Las clonas híbridas se observaron en un microscopio (Olympus), se seleccionaron aquellas colonias que reconocieron a nuestro antígeno y se clonaron.

Clonación: La clonación se realizó por el método de dilución limitante, se tomaron 50 µl de células híbridas, que se encontraban en confluencia, se realizó una dilución 1:10 con medio DMEM. De la mezcla anterior se hicieron las siguientes diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10000, se contaron las células y se eligió la dilución adecuada para tener 1 célula/pozo, las cuales se colocaron en una microplaca con macrófagos de peritoneo, posteriormente se seleccionaron los pozos con una colonia la cual se resuspendió y creció en varios pozos, se realizaron tres reclonaciones y el hibridoma seleccionado se puso en botellas para aumentar el número de células.

SUEROS: Se utilizaron 9 sueros tomados del cordón umbilical de niños recién nacidos provenientes de personas que durante su embarazo no presentaron amibiasis, del Hospital de Ginecopediatría No 3 "A" del Instituto Mexicano del Seguro Social como testigos negativos de amibiasis; 15 sueros de personas infectadas con otros parásitos, 19 sueros de portadores asintomáticos de *E. histolytica*, estos fueron donados por la Universidad Nacional Autónoma de México y 24 sueros de personas con absceso hepático amibiano del Hospital General de la Secretaría de Salud.

INMUNOENSAYO ENZIMATICO EN FASE SOLIDA (ELISA): El reconocimiento del anticuerpo monoclonal y de los sueros (humanos) al antígeno (extracto de glicoproteínas) se realizó por ELISA. Se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo plano (Nunc maxisorp) las cuales fueron recubiertas utilizando 100 μ l/pozo de antígeno a una concentración de 50 μ g/ml en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.5, se incubaron 1 h a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C, después las placas se lavaron 4 veces con PBS- Tween (PBS-T) al 0.05 %, los pozos se bloquearon con PBS-Leche al 5 % (PBS-L) a 37°C / 2 h y se lavaron. Posteriormente se agregaron 100 μ l del sobrenadante de los anticuerpos monoclonales o de los sueros diluidos 1:100 en PBS-L por duplicado; se incubaron 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, en el caso de los anticuerpos monoclonales. Los sueros se incubaron 1h a 37°C, las microplacas se lavaron 6 veces con PBS-T, se les agregó el conjugado anti ratón policlonal unido a peroxidasa diluido 1:1200 o conjugado anti Ig G humana diluido 1:3500 (Sigma) en PBS-L, se incubó 90 min. a 37°C. El conjugado se removió al lavar 6 veces con PBS-T, se reveló agregando 100 μ l de sustrato (OPD [orto-fenilendiamina] 10 mg, H₂O₂ 0.1 %, amortiguador de citratos 0.1 M pH 5.6) se incubó a temperatura ambiente / 10 min., la reacción se detuvo al agregar 100 μ l de ácido clorhídrico (HCl) 3 N, la placa se leyó en un lector de ELISA (Dynatech MR 5000) a una longitud de onda de 492 nm.

DETERMINACIÓN DE ISOTIPO: Para la determinación de isotipo se utilizaron microplacas previamente recubiertas con el antígeno (extracto de glicoproteínas) a una concentración de

50µg/ml y bloqueadas, se colocaron 100 µl del anticuerpo monoclonal, e incubo 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, se lavó y se adicionó 50 µl de anticuerpo de conejo anti – IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, cadena κ o cadena λ de ratón, se incubó 30 min. a temperatura ambiente, las microplacas se lavaron 3 veces con PBS-T, se agregó el conjugado anti IgG de conejo unido a fosfatasa, e incubó a temperatura ambiente 30 min., se lavó y se reveló con el sustrato (ABTS, H₂O₂ 0.03%, amortiguador de citratos 0.01 M pH 5) incubando por 10 min. a temperatura ambiente y se leyó a 405 nm.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET): El extracto de glicoproteínas de membrana de *E. histolytica* fue separado por medio de un gel de poliacrilamida al 10 % con SDS (PAGE – SDS) utilizando el método de Laemmli (65), el cual se corrió a 150 volts constantes, el gel se dejó estabilizar por 1 h en el amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %), la transferencia se realizó según el método de Towbin (66), utilizando una cámara de transferencia (BIO RAD) el gel se transfirió a papel de nitrocelulosa a 300 mA/2 h., este se bloqueó con PBS-L incubándolo 2 h a 37°C y toda la noche a 4°C, posteriormente se cortó en tiras de 5mm, las cuales fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal diluido 1:10 por 2 h a 37°C y durante toda la noche a 4°C, o con los sueros diluidos 1:75 en PBS-L e incubándolos a temperatura ambiente toda la noche, la tiras se lavaron 10 veces con PBS-T y 5 veces con PBS, se incubaron con el conjugado anti IgG de ratón unido a peroxidasa diluido 1:120 (Sigma) o anti IgG humana diluido 1:500 en PBS-L por 1 h a 37°C, se lavaron y revelaron con el sustrato de transferencia (4-Cloro-α-naftol 0.05 %, metanol 20 %, H₂O₂ 0.015 % en PBS), para detener la reacción se lavaron con agua, los pesos moleculares no se bloquearon y se tiñeron con amido negro (Bio Rad).

INMUNOFLUORESCENCIA: Trofozoitos de cultivo axénico en fase logarítmica, se lavaron con PBS pH 7.2 y se centrifugaron a 1200 r.p.m./10 min. a 4°C, el paquete celular se lavó tres veces. El paquete se ajustó a una concentración de 1×10^6 trofozoitos/ml en PBS y se colocaron sobre la superficie de un portaobjetos, se secaron a temperatura ambiente y

fueron fijados con alcohol etílico por 45 min., el exceso de fijador se eliminó lavando con PBS. Las preparaciones se incubaron con el anticuerpo diluido 1:10 a 37°C/30 min., se lavaron 5 veces con PBS, se incubaron por 30 min. a 37°C con el conjugado anti IgG de ratón unido a isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1:50, para eliminar el exceso de conjugado se lavaron con PBS. La fluorescencia se leyó en un microscopio de fluorescencia (Olympus) (17,67).

ELISA EN PAPEL (DOT-ELISA): Se utilizaron trofozoitos de cultivo axénico en fase logarítmica, para su concentración se centrifugaron a 1200 r.p.m./10 min. a 4°C desechándose el sobrenadante, el paquete celular se lavó tres veces con PBS pH 7.2, los trofozoitos se ajustaron a una concentración de 1×10^7 células/ml, se fijaron con formaldehído al 2 %, e incubaron a temperatura ambiente / 10 min., se lavaron dos veces con PBS, con la finalidad de eliminar la actividad endógena de peroxidasa, se agregó 500µl de H₂O₂ al 3 % e incubó a temperatura ambiente / 5 min., se lavó con PBS y se colocó 25 µl de la suspensión celular en papel de nitrocelulosa y se incubó a 56°C / 30 min., se bloqueó con PBS-L a 37°C / 2 h, se lavaron 4 veces con PBS-T y 3 veces con PBS, se adicionó 500 µl del anticuerpo monoclonal diluido 1:10 en PBS-L, el cual se incubó a 37°C/1h y posteriormente toda la noche a 4°C, se lavó e incubó con el conjugado anti Ig G de ratón unido a peroxidasa 1:120, se reveló con el sustrato para transferencia (4-Cloro-α-naftol).

INHIBICIÓN DE LA UNIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL CON SU ANTIGENO EMPLEANDO CARBOHIDRATOS: Se utilizaron microplacas recubiertas con el antígeno a una concentración de 50µg / ml y bloqueadas, se colocaron 100µl del anticuerpo monoclonal y se incubó a 37°C/1 h posteriormente toda la noche a 4°C, el anticuerpo previamente fue incubado a 37°C/1 h con diferentes carbohidratos (glucosa, glucosamina, N-acetil-glucosamina, galactosa, galactosamina, manosa y fucosa), a una concentración final de 150 mM las microplacas se lavaron con PBS-T, se adicionó el conjugado anti IgG de ratón unido a peroxidasa e incubaron 90 min. / 37°C. El conjugado se removió al lavar con PBS-T, se

reveló con 100µl de sustrato (OPD), la reacción se detuvo al agregar 100µl de HCl 3 N, se leyó a 492 nm. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición.

TRATAMIENTO DEL ANTIGENO CON TRIPSINA: El antígeno se incubó con diferentes concentraciones de tripsina en PBS pH 7.2 de 0.25 hasta 200 µg/ml por 1 h a 37°C, el antígeno se utilizó para recubrir una microplaca de ELISA, la cual se bloqueó con PBS-L, se incubó con el anticuerpo monoclonal diluido 1:20, se lavó con PBS-T, se incubó con el conjugado anti IgG de ratón unido a peroxidasa y se reveló con el sustrato, la reacción se detuvo al adicionar HCl 3N y se leyó a 492nm. Los resultados se expresaron en porcentaje de pérdida de reconocimiento (68).

TRATAMIENTO DEL ANTIGENO CON METAPERYODATO DE SODIO: Una microplaca de ELISA previamente recubierta con el antígeno a una concentración de 50 µg/ml se incubó con diferentes concentraciones de metaperyodato de sodio en amortiguador de acetatos (0.05 M pH 4.6) desde 0.025 hasta 0.1 M, toda la noche a 4°C y se lavó con PBS-T. Se bloqueó con PBS-L, se incubó con el anticuerpo monoclonal diluido 1:20 y se lavó con PBS-T. Enseguida se incubó con el conjugado anti IgG de ratón unido a peroxidasa y se reveló con el sustrato (OPD), la reacción se detuvo al adicionar HCl 3N y se leyó a 492nm. Los resultados se expresaron en porcentaje de pérdida de reconocimiento (68).

FAGOCITOSIS: Se utilizaron trofozoítos de cultivo axénico en fase logarítmica, para su concentración se centrifugaron a 1200 r.p.m./10 min. a 4°C desechándose el sobrenadante, el paquete celular que se lavó con PBS pH 7.2 y se ajustó a una concentración de 1×10^6 trofozoítos/ml en medio TYS-33, se adicionó 200µl de trofozoítos/pozo a placas de 4 pozos (Nunc), que previamente se les había colocado 200 µl de medio TYS-33, se incubaron a 36°C/1 h, se lavaron en dos ocasiones con medio, se les agregó 200 µl de eritrocitos frescos de humano (tipo A Rh +) ajustados con medio a una concentración de 1×10^8 células/ml, se incubaron a 36°C / 10 min., se lavaron dos veces con PBS, se les agregó amortiguador de

lisis, el cual se dejó incubar a temperatura ambiente/6 min., se lavaron con PBS, se fijaron con 400 µl de paraformaldehído al 3 % en PBS 0.1 M pH 7.4 y finalmente se contó el número de eritrocitos fagocitados por 100 trofozoítos en un microscopio Olympus (15-17).

INHIBICIÓN DE LA FAGOCITOSIS: Se utilizaron trofozoítos ajustados a una concentración de 1×10^6 trofozoítos/ml en medio TYS-33, colocando 200µl de suspensión celular/pozo, se incubaron a 36°C/1 h, se lavaron en dos ocasiones con medio, se incubaron con el anticuerpo monoclonal diluido en medio TYS-33 1:5, 1:10 y 1:20, a 4°C/30 min., se lavaron y se colocaron 200 µl de eritrocitos a una concentración de 1×10^8 células/ml, se incubaron a 36°C/10 min., se lavaron, se les agregó amortiguador de lisis, se incubó a temperatura ambiente / 6 min., posteriormente se lavaron con PBS para eliminar todos los eritrocitos, se fijaron con 400 µl de paraformaldehído y se contó el número de eritrocitos fagocitados por 100 trofozoítos (15,16). Los resultados se expresaron en porciento de inhibición de fagocitosis

PREPARACIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-IDIOTIPO (Ab 2): Se obtuvo la porción F(ab)₂ del anticuerpo monoclonal. El anticuerpo se dializó en amortiguador de acetatos pH 4.5 durante 3 h, se adicionó la pepsina en una relación de 2 mg de enzima por cada 100 mg de anticuerpo, se incubó toda la noche a 37°C, se ajustó el pH a 7.4 y se dializó en PBS. Se pasó por una columna de sepiadex G-100, para separar la tracción F(ab)₂. Se utilizaron conejos Nueva Zelanda de 2 Kg. de peso, los cuales fueron inmunizados con 300 µg del F(ab)₂ en ACF (Gibco), por vía intradérmica cada quince días durante 2 meses hasta obtener una buena respuesta, una semana después de la última inmunización se sangraron los conejos cortando la vena marginal de la oreja, previamente dilatada con xilol. El suero obtenido se fraccionó en tubos eppendorf y se guardaron a - 70°C.

PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-IDIOTIPO: Las gammaglobulinas de conejo anti-idiotipo (anti-Id) se obtuvieron al precipitar el suero de conejo anti-Id con sulfato de amonio al 33 %, se resuspendieron y dializaron en PBS, estas se pasaron por una columna de sepharosa 4B (Pharmacia Fine Chemicals) la cual fue activada con CNBr (bromuro de cianógeno) y acoplada a gammaglobulina normal de ratón (GNR) en una concentración de 5 mg de GNR / ml de sepharosa, los anticuerpos de conejo se aplicaron por la columna la fracción retenida se eliminó con glicina 0.1 M pH 2.3, para comprobar que el suero de conejo reconocía al anticuerpo monoclonal pero no a GNR se utilizó la técnica de ELISA; las microplacas fueron recubiertas con concentraciones crecientes (logarítmicas) de GNR y anticuerpo monoclonal, se adicionó 100 μ l del anticuerpo anti-Id a una concentración de 40 μ g/ml, se incubó 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C se adicionó el conjugado anti-IgG de conejo diluido 1:800, se incubó 1 h a 37°C, se reveló con el sustrato para ELISA (OPD) y se leyó a 492 nm. Cuando el anticuerpo de conejo anti-Id únicamente reconoció al monoclonal se guardó a - 70 °C hasta su uso.

DETECCIÓN DEL IDIOTIPO (Id) EN EL ANTICUERPO MONOCLONAL: Para separar cadena ligera de cadena pesada, el anticuerpo monoclonal se sometió a un campo eléctrico en geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones reductoras (con SDS), a los cuales se aplicaron 150 volts, los geles se estabilizaron por 30 min. en amortiguador de transferencia, posteriormente se transfirieron a papel de nitrocelulosa a 300 mA/2 h. El papel de nitrocelulosa se bloqueó al incubarlo 2 h a 37°C con PBS-L toda la noche a 4°C. El papel se cortó en tiras de 5mm, las cuales fueron incubadas con los antisueros 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C se ocuparon los siguientes sueros: anti-Id de conejo como problema y como testigo suero anti Ig G de ratón, se lavaron 6 veces con PBS-T y 3 veces con PBS, se incubaron con el conjugado anti IgG de conejo unido a peroxidasa diluido 1:100 PBS-L por 1 h a 37°C, se lavaron y se revelaron con el sustrato para transferencia (4-Cloro- α -naftol), para detener la reacción se lavaron con agua. Se determinó la banda de reacción de acuerdo al testigo positivo y pesos moleculares.

INHIBICIÓN DE LA UNIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL CON EL ANTICUERPO ANTI IDIOTIPO UTILIZANDO AL ANTÍGENO O AL ANTICUERPO MONOCLONAL: Esta prueba se realizó para determinar si a) el anticuerpo anti-Id reconoce al idiotipo y b) determinar si el anticuerpo anti-idiotipo es del tipo α , β o γ (69).

- a) **Inhibición del anticuerpo anti-Id por el idiotipo:** Microplacas para ELISA fueron recubiertas con 100 μ l del anticuerpo monoclonal (idiotipo) a una concentración de 10 μ g/ml, se bloquearon con PBS-L, se adicionó el sobrenadante de la mezcla que se realizó en tubos eppendorf con cantidades constantes del anticuerpo anti-Id y concentraciones crecientes del Id (0, 2.75, 5.5, 11 y 22 μ g/ml) previamente incubados a 37°C/2 h (fase líquida), los sobrenadantes se incubaron en la microplaca por 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C (fase sólida), se adicionó el conjugado anti IgG de conejo-peroxidasa diluido 1:800 en PBS-L, se reveló con el sustrato para ELISA (OPD), la reacción se detuvo con HCl 3 N y se leyó a 492nm. Los resultados se expresaron en porciento de inhibición
- b) **Inhibición del idiotipo por unión del antígeno:** : Microplacas para ELISA fueron recubiertas con 100 μ l del anticuerpo anti-Id a una concentración de 10 μ g/ml, se bloquearon con PBS-L, después se adicionó el sobrenadante de la mezcla realizada con cantidades constantes del anticuerpo monoclonal y concentraciones crecientes (0, 0.3, 1.25, 5, 7.5, 10 y 15 μ g/ml) del extracto de glicoproteínas de membrana de *E. histolytica* previamente incubados a 37°C/2 h (fase líquida), se incubaron en la microplaca por 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C (fase sólida), posteriormente se adicionó el conjugado anti IgG de ratón unido a peroxidasa, se reveló con el sustrato para ELISA (OPD), la reacción se detuvo con HCl 3 N y se leyó a 492 nm. Los resultados se expresaron en porciento de unión del anticuerpo monoclonal con el anticuerpo anti idiotipo.

DETECCIÓN DEL IDIOTIPO EN SUEROS: Se determinó por ELISA utilizando como antígenos el anticuerpo anti-Id y gammaglobulina normal de conejo (GNC) a una concentración de 10 μ g/ml. Se utilizaron sueros de pacientes con absceso hepático amibiano, portadores

asintomáticos, infectados con otros parásitos y como testigos negativos suero del cordón umbilical diluidos 1:100. La mitad de las microplacas se recubrieron con el anticuerpo anti-Id y la otra mitad con GNC, se bloquearon, se adicionaron los sueros diluidos 1:100 en PBS-L lo cual se realizó por duplicado, se incubaron 1 h a 37°C, se lavaron con PBS-T, se agregó el conjugado anti IgG humano unido a peroxidasa, se reveló con el sustrato para ELISA (OPD) se detuvo la reacción y se leyó a 492 nm. La densidad óptica obtenida con la GNR se restó de la densidad óptica con el anticuerpo anti -Id.

OBTENCIÓN DEL ANTICUERPO Ab3 (Anticuerpo anti – anti Id): Se utilizaron conejos Nueva Zelanda de 2 Kg. de peso, los cuales fueron inmunizados con 25 µg del anticuerpo anti- idiotipo (Ab 2) en ACF, por vía intradérmica cada quince días durante 2 meses, una semana después de la última inmunización se sangraron los conejos cortando la vena marginal de la oreja previamente dilatada con xilol. El suero obtenido se fraccionó y se guardó a - 70°C.

CARACTERIZACIÓN DEL ANTICUERPO Ab3: Para la caracterización del anticuerpo Ab 3 se utilizó la técnica de ELISA. Microplacas previamente recubiertas con 100 µl/pozo del antígeno (extracto de glicoproteínas) a una concentración de 50 µg/ml se bloquearon con PBS-L e incubaron 1 h a 37°C con el anticuerpo Ab 3 diluido 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200 en PBS-L, posteriormente se lavaron con PBS-T, se adicionó el conjugado anti IgG de conejo unido a peroxidasa, se reveló con el sustrato para ELISA (OPD) se detuvo la reacción y se leyó a 492 nm.

Para comprobar que el anticuerpo Ab 3 reconocía la misma banda que el anticuerpo monoclonal (Ab 1) se realizó una inmunoelectrotransferencia. El extracto de glicoproteínas de membrana de *E. histolytica* fue separado por medio de un gel de poliacrilamida al 10 % con SDS, se transfirió a papel de nitrocelulosa a 300 mA/2 h.. El papel de nitrocelulosa se bloqueó con PBS-L incubándolo 2 h a 37°C y toda la noche a 4°C. El papel se cortó en tiras de 5mm, las cuales fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal (Ab1) por 2 h a 37°C posteriormente toda la

noche a 4°C, o con el anticuerpo Ab3 diluido 1:25 en PBS-L e incubado a temperatura ambiente toda la noche, las tiras se lavaron 10 veces con PBS-T y 5 veces con PBS, se incubaron con el conjugado anti IgG de ratón unido a peroxidasa diluido 1:120 o anti-conejo diluido 1:500 en PBS-L por 1 h a 37°C, se lavaron y revelaron con el sustrato para transferencia (4-Cl- α -naftol), para detener la reacción se lavaron con agua, los pesos moleculares no se bloquearon y se tiñeron con amido negro.

PRUEBA ESTADÍSTICA: La comparación entre los distintos grupos: 1) suero del cordón umbilical, 2) infectados con otros parásitos, 3) portadores asintomáticos y 4) AHA, utilizando como antígeno el anticuerpo anti idiotipo se hizo con la prueba paramétrica ANOVA, a fin de determinar la sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de AHA, primero se determinó el mejor punto de corte de la prueba mediante la construcción de una curva ROC.

RESULTADOS.

Para la realización de este trabajo se utilizó la cepa patógena HMI:IMSS de *Entamoeba histolytica*, la cual previamente fue inoculada en hígado de hámster, para utilizar los trofozoitos recuperados del absceso hepático amibiano, con la finalidad de asegurar la virulencia de la cepa, que se pierde durante cultivos axénicos prolongados.

Las amibas fueron cultivadas en medio axénico complementado y cosechadas cuando se encontraban en fase logarítmica de crecimiento, en virtud del alto contenido de proteasas de la amiba, antes de romper los trofozoitos en forma mecánica se resuspendieron en amortiguador de tris con inhibidor de proteasas (pHMB); la extracción de glicoproteínas se realizó tres veces utilizando un amortiguador. Para comprobar que en el extracto se encontraban glicoproteínas se procedió a determinar la concentración de proteínas y carbohidratos, dando como resultado una relación carbohidrato:proteína de 1:1.7, asegurando que en el extracto se encontraban glicoproteínas.

El peso molecular de las diferentes proteínas presentes en el extracto de glicoproteínas se determinó en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida con SDS al 10 %, pudiendo observar 11 bandas que van desde 20 kDa de peso molecular hasta más de 200 kDa (Figura 3).

Utilizando el método de Köller y Milstein se realizó la fusión con linfocitos de bazo de ratón Balb/c inmunizado y células de mieloma P3-x63-Ag8, para la obtención del anticuerpo monoclonal. De la fusión se obtuvieron 14 hibridomas, de éstos 4 eran hibridomas secretores de anticuerpos con la capacidad de reconocer el extracto de glicoproteínas. La lectura más alta en ELISA la dio el sobrenadante del hibridoma 4F3, la cual fue de 1.976 en D.O (densidad óptica), por lo que se seleccionó para su clonación, de esta clonación se obtuvo crecimiento en seis pozos, estos hibridomas reconocieron al antígeno pero presentaban mezcla de isotipos IgG e IgM, por lo que se seleccionó uno de ellos para reclonarlo. Realizando otras dos reclonaciones más, se seleccionó al anticuerpo monoclonal 4F3B4B7E4C7 (4^oC₇) que presentaba un solo isotipo (IgG) y buen reconocimiento al antígeno (Figura 4). A fin de aumentar la concentración del anticuerpo se inocularon las células productoras del anticuerpo

monoclonal con pristano en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c hembras, para la producción de líquido de ascitis, el cual se cuantificó empleando la técnica de ELISA dándonos una D.O de 0.800 con una dilución de 1:20.

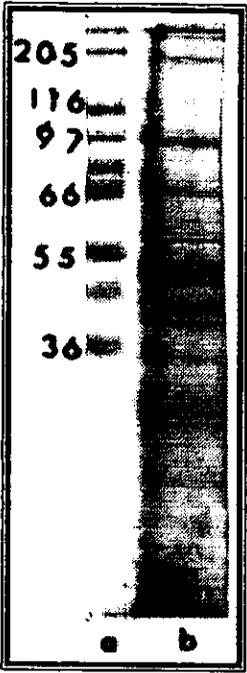


Figura 5. Patrón electroforético del extracto de glicoproteínas de *E. histolytica*. El extracto de glicoproteínas de membrana de *E. histolytica* se corrió en condiciones reductoras en gel de poliacrilamida al 10 % con SDS. En el carril a) se muestran los marcadores de peso molecular, en el carril b) el extracto de glicoproteínas

Una vez seleccionado y clonado el anticuerpo monoclonal 4°C₇, se procedió a su caracterización. La determinación del isotipo del anticuerpo se realizó por la técnica de ELISA, se encontró que el anticuerpo monoclonal presenta una cadena pesada de clase IgG1 y una cadena ligera κ.

La figura 5 muestra una inmunoelectrotransferencia donde se corrió el extracto de glicoproteínas, se incubó con el anticuerpo monoclonal diluido 1:10 y como control negativo se utilizó sobrenadante de las células P3-x63-Ag8. Dando como resultado el reconocimiento del anticuerpo monoclonal 4°C₇ por una glicoproteína de 66 kDa.

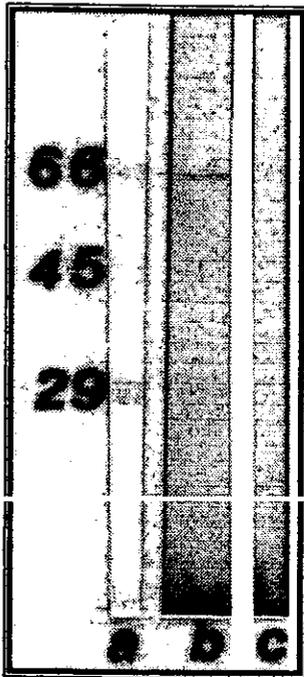


Figura 5. Reconocimiento de la glicoproteína de 66 kDa por el anticuerpo monoclonal (4°C₇). Se realizó una IET del extracto de glicoproteínas de *E. histolytica* la cual se incubó con el anticuerpo monoclonal b) y con el sobrenadante de células P3-x63-Ag8 c), por 2 h a 37°C y durante toda la noche a 4°C. Los marcadores de peso molecular se tiñeron con amido negro a). Como se puede observar el anticuerpo monoclonal reconoce una banda de 66 kDa.

Establecido el reconocimiento del anticuerpo monoclonal 4°C₇, se investigó que porción de la glicoproteína de 66 kDa (oligosacárida o proteica) es reconocida por el anticuerpo, se trató al antígeno con diferentes concentraciones de tripsina, para eliminar la porción proteica del antígeno y observar si disminuía la interacción antígeno – anticuerpo, se encontró que la unión del anticuerpo 4°C₇ con su antígeno disminuyó en un 64.7 % a una concentración de tripsina de 200 µg/ml, por lo que se infiere que el anticuerpo monoclonal reconoce preferentemente la porción proteica del antígeno. Figura 6.

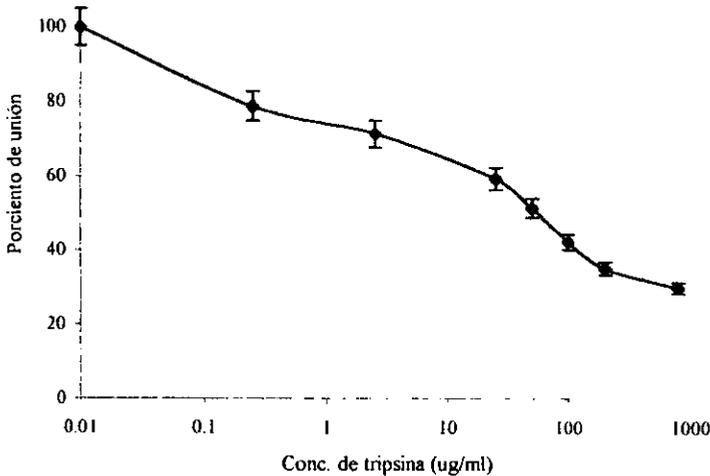


Figura 6. Porcentaje de unión del anticuerpo monoclonal con el antígeno tratado con tripsina. El antígeno (extracto de glicoproteínas) se trató con diferentes concentraciones de tripsina (0.25, 2.5, 25, 100 y 200 µg/ml) por 1 h a 37°C, con la finalidad de eliminar la porción proteica del antígeno, este antígeno se incubó con el anticuerpo monoclonal diluido 1:20. La gráfica muestra que el anticuerpo monoclonal pierde el reconocimiento por el antígeno tratado, lo que indica que el anticuerpo está dirigido principalmente contra la porción proteica.

El antígeno se trató con metaperiodato de sodio a diferentes concentraciones, los resultados demuestran que el reconocimiento del anticuerpo monoclonal por su antígeno disminuye en un 36.3 % a una concentración de metaperiodato de sodio de 0.75 M. Figura 7.

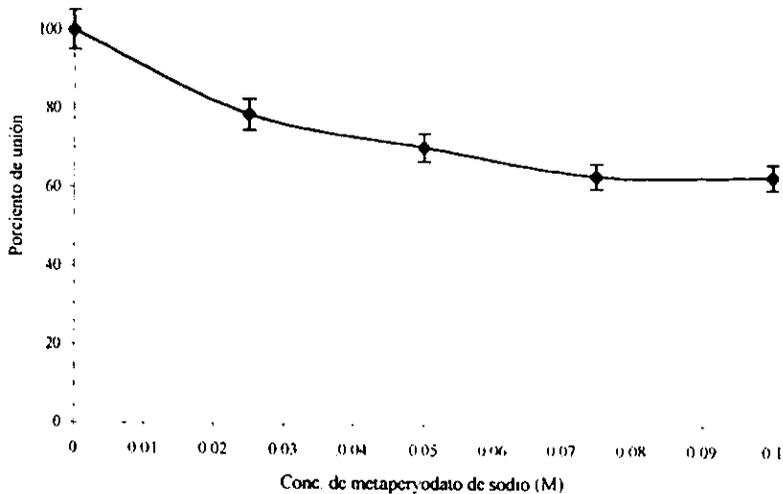


Figura 7. Porcentaje de unión del anticuerpo monoclonal con el antígeno tratado con metaperiodato de sodio. El antígeno (extracto de glicoproteínas) se trató con diferentes concentraciones de metaperiodato de sodio (0.025, 0.05, 0.075 y 0.1 M) toda la noche a 4°C, con la finalidad de eliminar la porción oligosacárida del antígeno, el antígeno se incubó con el anticuerpo monoclonal diluido 1:20. La gráfica muestra que la interacción antígeno – anticuerpo, se inhibe en un 36.3 % al tratar el antígeno con metaperiodato.

Por tanto se investigó que monosacáridos podrían estar actuando en esta interacción; el anticuerpo monoclonal se pre-incubó con los siguientes monosacáridos a una concentración final de 150 mM: glucosamina, glucosa, N-acetil-glucosamina, manosa, galactosa, galactosamina y fucosa. Los monosacáridos que mejor inhibieron la interacción entre el anticuerpo monoclonal y el antígeno en aproximadamente un 30 % fueron la glucosamina y la glucosa, los monosacáridos que tuvieron un porcentaje de inhibición menor al 12 % fueron la galactosa y la fucosa (Figura 8). Estos resultados muestran la participación principal de la glucosamina en el reconocimiento del anticuerpo monoclonal a la glicoproteína.

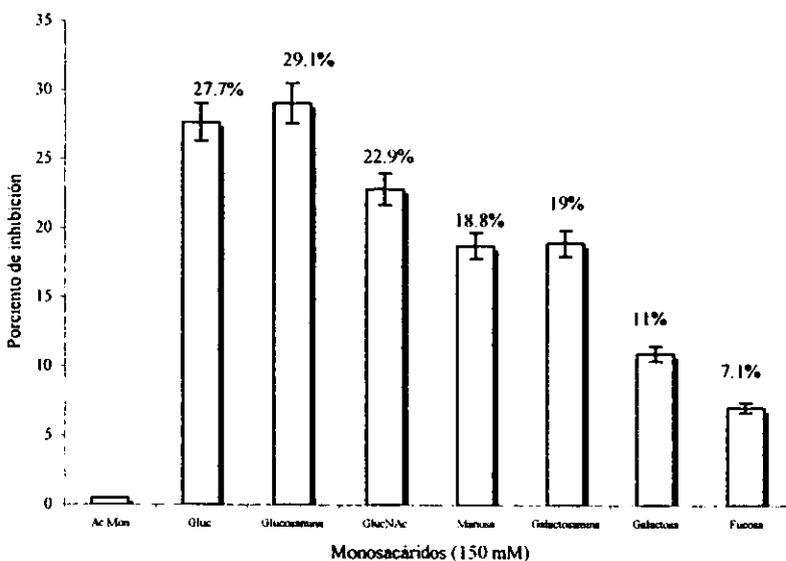
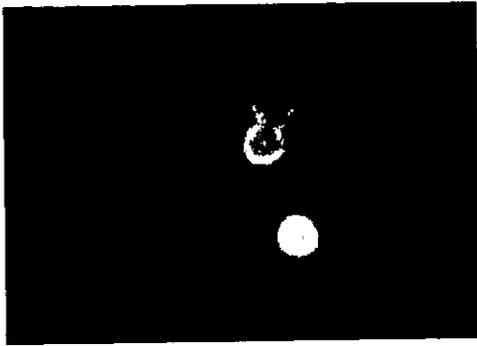


Figura 8: Inhibición de la interacción antígeno-anticuerpo monoclonal empleando carbohidratos. El anticuerpo 4^oC₇ se preincubó a 37°C / 1 h con diferentes monosacáridos (glucosa, glucosamina, GlucNAc, manosa, galactosamina, galactos y fucosa) a una conc. final de 150 mM, posteriormente el anticuerpo monoclonal se incubó con el antígeno. Mostrando que la glucosa y glucosamina inhiben en un 27.7 y 29.1 % respectivamente el reconocimiento del anticuerpo por el extracto de glicoproteínas.

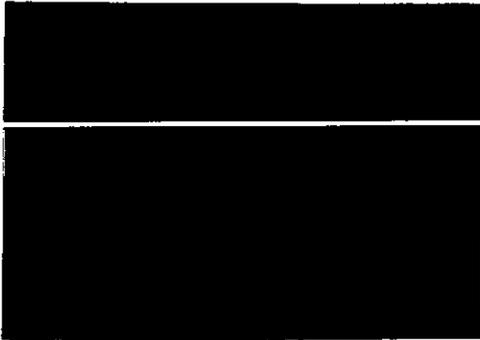
La localización de la glicoproteína de 66 kDa en la amiba, se realizó por inmunofluorescencia. Los trofozoítos de *E. histolytica* se fijaron con alcohol etílico, se incubaron en presencia del anticuerpo diluido y con el conjugado anti IgG de ratón unido a fluoresceína se pudo observar que toda la superficie del trofozoito presentaba fluorescencia, demostrando que la glicoproteína se encuentra en la superficie de *E. histolytica*, el control negativo por el contrario no presentó fluorescencia en la superficie de la amiba. Figura 9. Otro ensayo que demostró la presencia de esta glicoproteína de 66 kDa sobre la superficie de la amiba fue la técnica de DOT ELISA, en la cual se utilizaron trofozoítos fijados con formaldehído, nuestros resultados muestran el reconocimiento del anticuerpo monoclonal en la superficie de *E. histolytica*, similar al control positivo (suero de conejo anti amiba), en contraste en el control negativo (suero normal de ratón) no se observó dicha reacción. Figura 10.



a)



b)



c)

Figura 9. Inmunofluorescencia de trofozoitos de *E. histolytica* utilizando el anticuerpo monoclonal. Los trofozoitos se incubaron con el anticuerpo monoclonal y con suero normal de ratón, a 37°C/30 min. Dando una fluorescencia positiva cuando se incubaron con el anticuerpo monoclonal a) y b) y una fluorescencia negativa con suero normal de ratón c).

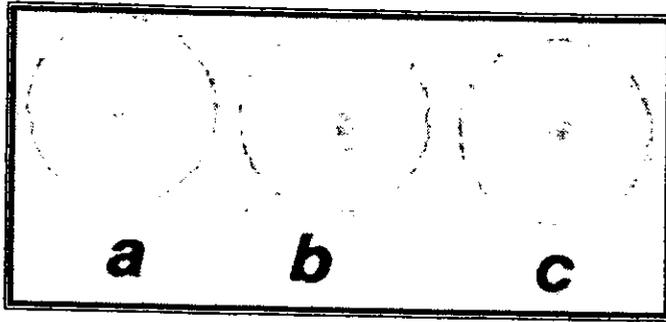


Figura 10. DOT-ELISA de trofozoitos de *E. histolytica* empleando el anticuerpo monoclonal. Los papeles de nitrocelulosa con trofozoitos fijados con formaldehido al 2% se incubaron con: a) suero normal de ratón como control negativo, b) suero de conejo anti amiba como control positivo y c) el anticuerpo monoclonal. Como se observa en la figura el anticuerpo ($4^{\circ}C_7$) tuvo una reacción positiva similar a la del control positivo.

La figura 11 muestra una inmunoelectrotransferencia del extracto de glicoproteínas, en la cual se observa que los sueros de AHA y en menor grado portadores asintomáticos, reconocen diferentes bandas del extracto de *E. histolytica* incluyendo la de 66 kDa. Los sueros del cordón umbilical y otros parásitos reconocen pocas o ninguna de las bandas del extracto.

Los resultados muestran que la glicoproteína de 66 kDa es reconocida por sueros de AHA y por el anticuerpo monoclonal de ratón, sugiriendo que este antígeno juega un papel importante en la respuesta inmune contra *E. histolytica* tanto en humanos como en ratón

La proteína de 66 kDa se encuentra glicosilada y se expresa en la superficie del trofozoito, estas características la hacen ser un buen candidato en el proceso de adhesión y/o fagocitosis de la amiba. Para determinar si esta glicoproteína intervenía en el proceso de fagocitosis, se procedió a realizar la prueba de inhibición de la fagocitosis utilizando el anticuerpo $4^{\circ}C_7$, como control positivo de fagocitosis se incubaron los trofozoitos con eritrocitos humanos, para la prueba de inhibición los trofozoitos previamente incubados con el anticuerpo monoclonal se incubaron con los eritrocitos. Figura 12. Para determinar la actividad fagocítica se contó el

número de eritrocitos fagocitados por cada 100 trofozoitos. Los resultados muestran que el proceso de fagocitosis se inhibió en un 26 %, 20 % y 15 % al preincubar los eritrocitos con el anticuerpo monoclonal diluido 1:5, 1:10 y 1:20 respectivamente. Figura 13.

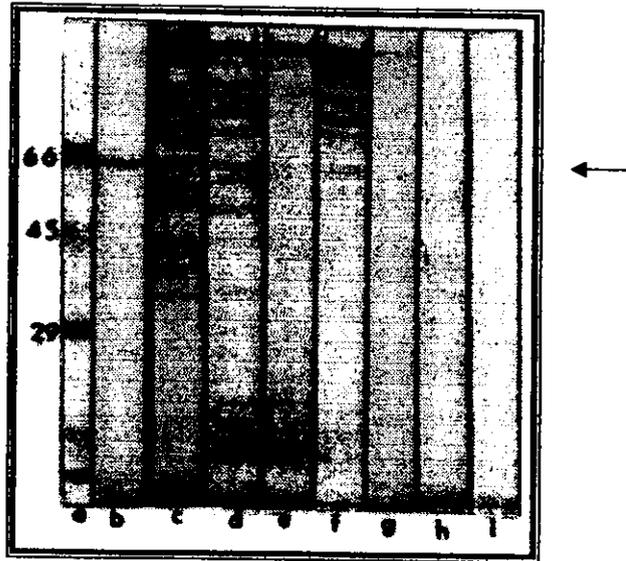
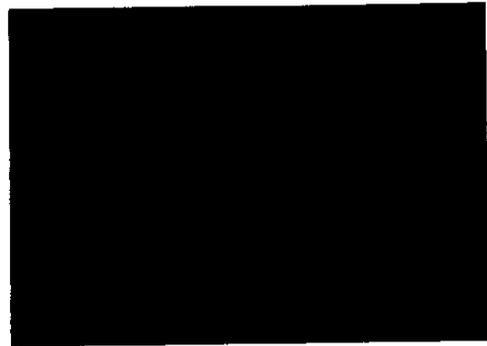


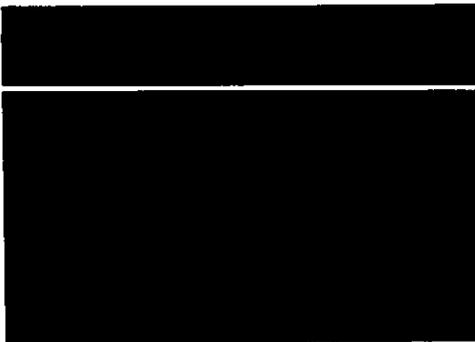
Figura 11. Inmunoelctrotransferencia del extracto de glicoproteínas de *E. histolytica*. Se realizó una IET del extracto de glicoproteínas de *E. histolytica* la cual se incubó con: el anticuerpo monoclonal a), sueros de ascoso nepanco amibano c) y d), de portadores asintomáticos e) y f), infectados con otros parásitos g) y h) y suero del cordón umbilical i), toda la noche a temperatura ambiente. Los marcadores de peso molecular se tiñeron con amido negro a). La flecha indica la banda de 66 kDa reconocida por el anticuerpo y por algunos sueros de pacientes



a)



b)



c)

Figura 12. Fagocitosis de eritrocitos humanos por trofozoitos de *E. histolytica*. Los trofozoitos se incubaron a 37°C/10 min con eritrocitos humanos figura a), en la figura b) se observan trofozoitos sin eritrocitos y en c) eritrocitos fagocitados por trofozoitos previamente incubados a 4°C/30 min. con el anticuerpo monoclonal.

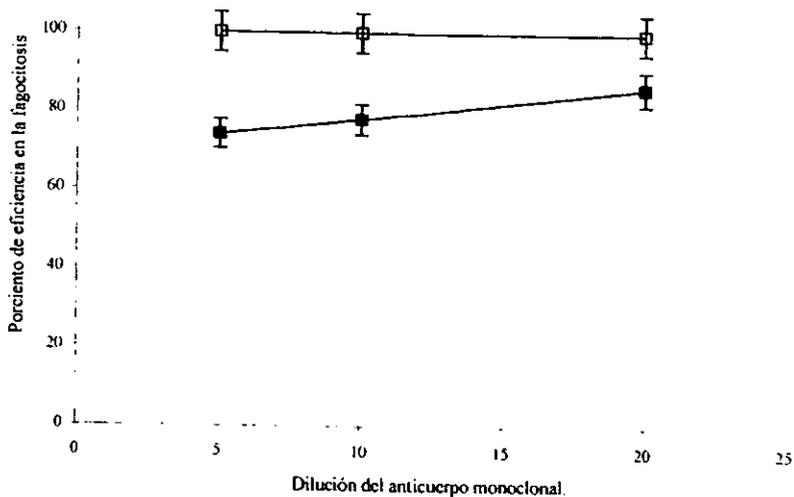


Figura 13 Inhibición de la fagocitosis por el anticuerpo monoclonal 4^C₇. La fagocitosis de los eritrocitos humanos por los trofozoitos se inhibió en un 26, 20 y 15 % al preincubar a 4^oC/30 min los trofozoitos con el anticuerpo monoclonal diluido 1:5, 1:10 y 1:20 (■). El 100 % de fagocitosis se obtuvo al incubar los trofozoitos con eritrocitos sin ser preincubados con el anticuerpo monoclonal (□)

El anticuerpo anti idiotipo (Ab 2) se obtuvo utilizando el idiotipo (Id) de la región variable del anticuerpo monoclonal (4^C₇), el anticuerpo anti Id se purificó por afinidad en columna de sepharosa 4B acoplada a gamma normal de ratón (GNR), con la intención de eliminar los anticuerpos que reconocieran determinantes antigénicos que no fuesen del idiotipo, para comprobar que el anticuerpo anti Id no reconocía la GNR se utilizó la técnica de ELISA, en la que se pudo observar que el anticuerpo anti Id no reconoce GNR pero es capaz de reconocer al anticuerpo monoclonal (Figura 14).

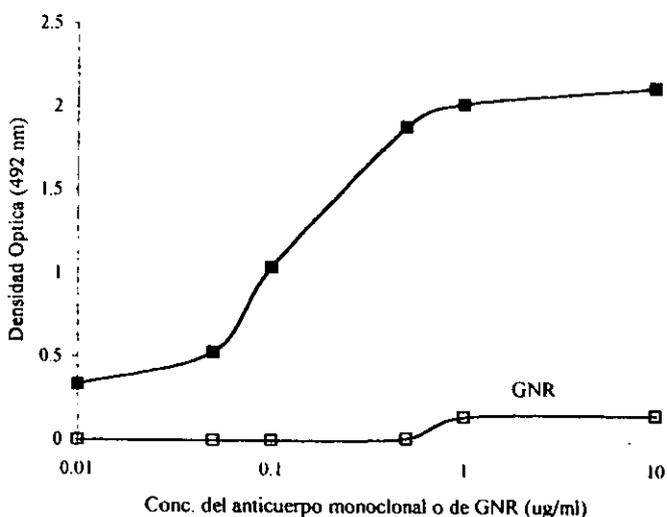


Figura 14. Reconocimiento del anticuerpo anti-Id por su antígeno. Utilizando como antígeno diferentes concentraciones (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$) del anticuerpo monoclonal (4°C_7) o de gamma normal de ratón (GNR) e incubandolo h a 37°C con el anticuerpo anti-Id. Se puede observar que el anticuerpo anti-Id reconoce al anticuerpo monoclonal.

La caracterización del anticuerpo anti idiotipo se determinó por la capacidad del anticuerpo anti Id para reconocer al Id. En una microplaca de ELISA recubierta con el idiotipo (anticuerpo monoclonal) se adicionó el sobrenadante de la fase líquida (cantidades constantes del anticuerpo anti - Id incubadas con concentraciones crecientes del Id). Al revelar la placa se observó que conforme se aumentaron las concentraciones del idiotipo en la fase líquida se disminuyó el reconocimiento del anticuerpo anti Id a su Id en la fase sólida (microplaca), esto lo expresamos en porciento de inhibición, obteniendo hasta un 81.8 % de inhibición, demostrando que el anticuerpo anti - Id reconoce a su Id (Figura 15).

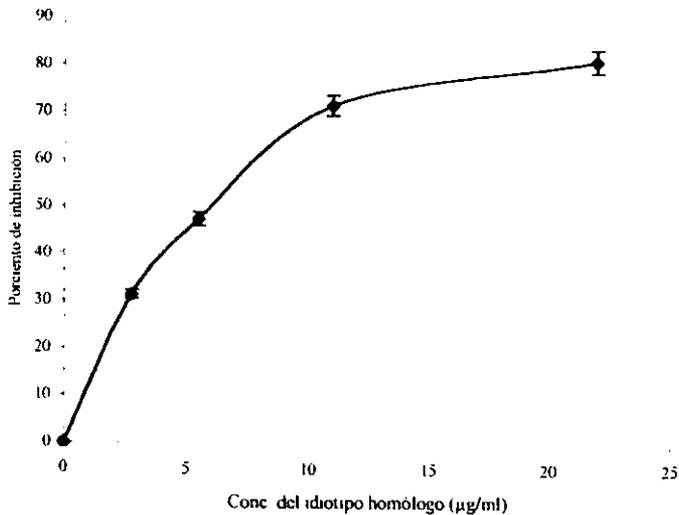


Figura 15. Inhibición de la interacción idiotipo (anticuerpo monoclonal) – anticuerpo anti -Id. Se preincubo el anticuerpo anti Id con concentraciones crecientes del Id a 37°C / 1 h en fase líquida. La mezcla se adicionó a una microplaca recubierta con el Id para determinar la unión del anticuerpo anti - Id. En la gráfica podemos observar que conforme va aumentando la concentración del Id homólogo en la fase líquida va aumentando el porcentaje de inhibición del anticuerpo anti - Id en la fase sólida.

Para determinar en que cadena del anticuerpo monoclonal se expresa el idiotipo, se realizó una IET del anticuerpo monoclonal en condiciones reductores para la separación de las cadenas ligeras de las pesada, se incubó con el anticuerpo anti Id, se colocó suero anti IgG1 y anti cadena ligera κ (dato no mostrado), dando como resultado el reconocimiento de la cadena pesada por el anticuerpo anti-idiotipo, por lo que el idiotipo se encuentra expresado en esta cadena (Figura 16).

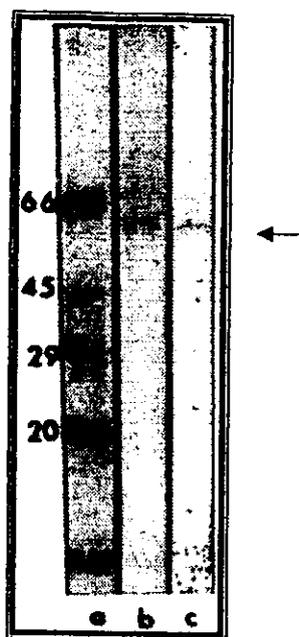


Figura 16. Expresión del idiotipo en el anticuerpo monoclonal. Se realizó una electroforesis en condiciones reductoras del anticuerpo monoclonal se transfirió a papel de nitrocelulosa y se incubó con el anticuerpo anti IgG1 de ratón b) y con el anticuerpo anti Id c), los marcadores de peso molecular se tiñeron con amido negro a). La flecha muestra que el anticuerpo anti-Id reconoce la misma banda que reconoce el anticuerpo anti IgG1.

Con el fin de definir la clase del anticuerpo anti Id (Ab2 α , Ab2B o Ab2 γ) se utilizaron microplacas para ELISA recubiertas con el anticuerpo anti-Id (fase sólida) a las cuales se les adicionó el sobrenadante fase líquida (cantidades constantes del anticuerpo monoclonal [Id] incubadas con concentraciones crecientes del extracto de glicoproteínas). El resultado se expresó en porcentaje de unión del idiotipo (anticuerpo monoclonal) al anticuerpo anti Id. Como se observa en la figura 17 al aumentar la concentración del antígeno en la fase líquida, el porcentaje de unión del anticuerpo monoclonal (Id) al anticuerpo anti Id (fase sólida) disminuye un 50%, descartando que el anticuerpo anti Id sea un Ab2 α ya que se sabe que la interacción Ab1 con Ab2 α no se ve afectada por el antígeno. A diferencia en nuestros resultados se vio afectada en un

50 %, por lo que queda la posibilidad de ser un Ab2 β o un Ab2 γ , ya que la interacción del Ab1 con cualquiera de los anteriores se ve afectada por el antígeno.

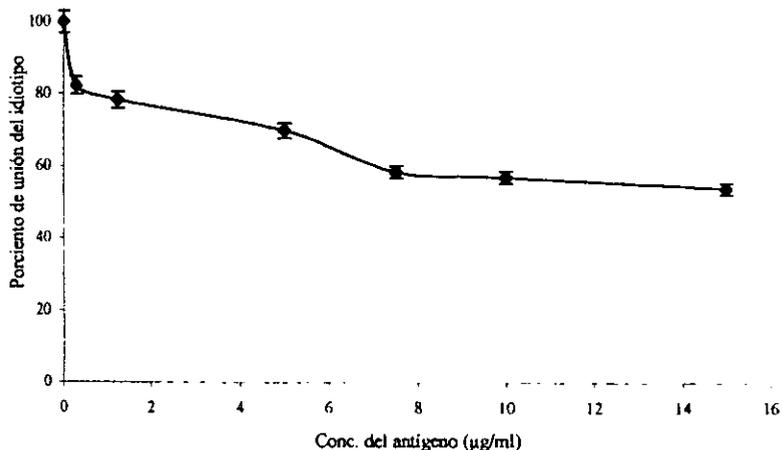


Figura 17. Porcentaje de unión del idiotipo (anticuerpo monoclonal) al anticuerpo anti – Id. Se preincubó el anticuerpo monoclonal con concentraciones crecientes del antígeno (0, 0.3, 1.25, 5, 7.5, 10 y 15 µg/ml) 1 h a 37°C en fase líquida. La mezcla se adicionó a una microplaca recubierta con el anticuerpo anti – Id, para determinar la unión Id-anticuerpo anti Id la cual se vio inhibida en un 50 % cuando el anticuerpo monoclonal se preincubo con el antígeno.

Para comprobar si era un Ab2 β (la imagen interna del antígeno) se obtuvo el anticuerpo Ab3, que fue capaz de reconocer al antígeno original, al emplear microplacas recubiertas con el extracto de glicoproteínas. El resultado obtenido fue una D.O. de 1.133 a una dilución 1:25, por lo tanto el anticuerpo Ab3 reconoce el extracto de glicoproteínas (Figura 18). A fin de comprobar que el anticuerpo Ab3 reconoce el mismo antígeno que el anticuerpo monoclonal se realizó una IET, observado que el anticuerpo Ab3 reconoce la misma banda que el anticuerpo monoclonal, confirmando que el anticuerpo anti Id es un anticuerpo Ab2 β que presenta la imagen interna del antígeno (Figura19).

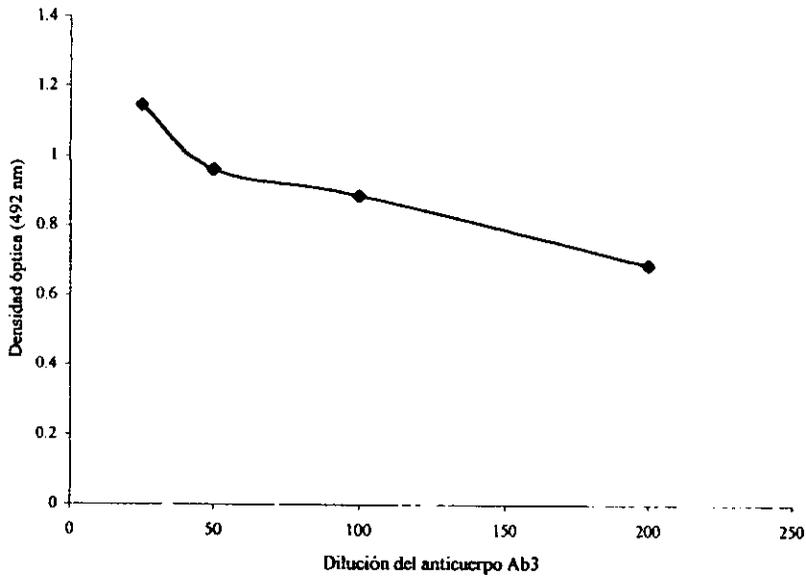


Figura 18. Reconocimiento del extracto de glicoproteínas de *E. histolytica* por el anticuerpo Ab3. Microplacas de ELISA recubiertas con el extracto de glicoproteínas fueron incubadas 1 h a 37°C con diferentes diluciones del anticuerpo Ab3. Con esta gráfica se demuestra que el anticuerpo Ab3 reconoce al extracto de glicoproteínas, por lo que el anticuerpo anti - Id es un Ab2β.

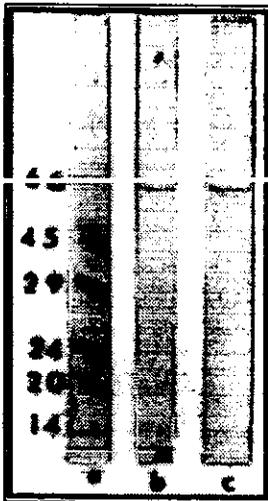


Figura 19. Reconocimiento de la glicoproteína de 66 kDa por el anticuerpo Ab3. La IET del extracto de glicoproteínas, se incubó por 2 h a 37°C, posteriormente toda la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal b) y con el anticuerpo Ab3 c), los marcadores de peso molecular se tiñeron con amido negro a). En la figura se puede observar que tanto el anticuerpo monoclonal como el Ab3 reconocen la misma banda de 66 kDa.

La expresión idiotípica de los sueros de pacientes se realizó a través de la técnica de ELISA, se acopló a microplacas el anticuerpo anti idiotipo (Ab2 β) que expresa la imagen interna del antígeno, posteriormente se incubaron con sueros de personas infectadas con otros parásitos, absceso hepático amibiano, portadores asintomáticos y se utilizó como testigo negativo sueros del cordón umbilical (Tabla 1).

GRUPO	NÚMERO DE SUEROS	MEDIA	DS	VALOR MÁXIMO	VALOR MÍNIMO
Cordón umbilical	9	0.118	0.074	0.267	0.071
Otros parásitos	15	0.124	0.054	0.243	0.046
Portadores asintomáticos	19	0.199	0.076	0.410	0.082
AHA	24	0.423	0.159	0.800	0.200

Tabla 1. Media y desviación estándar de los distintos grupos de trabajo . En esta tabla se muestran las medias y desviaciones estándar (DS) de los diferentes grupos de trabajo, al utilizar al anticuerpo anti idiotipo como antígeno en la técnica de ELISA, al igual que el valor máximo y mínimo para cada uno.

Como nuestros resultados presentaron una distribución normal se utilizó la prueba paramétrica ANOVA para comparar los diferentes grupos y determinar si existían diferencias entre ellos. Los resultados obtenidos muestran que el grupo de AHA es diferente al de portadores asintomáticos, infectados con otros parásitos y del cordón umbilical (negativos) con una $p < 0.005$. En cambio, no se encontró una diferencia significativa entre los grupos de: portadores asintomáticos, otros parásitos y cordón umbilical. Por lo que al utilizar el anticuerpo anti -Id como antígeno nos permite diferenciar entre el suero proveniente de pacientes con AHA de aquellos que no lo padecen.

Utilizando la curva ROC se determinó como punto de corte una lectura de 0.233 en D.O. con una sensibilidad del 91.6 % y una especificidad del 88.3 % Figura 20.

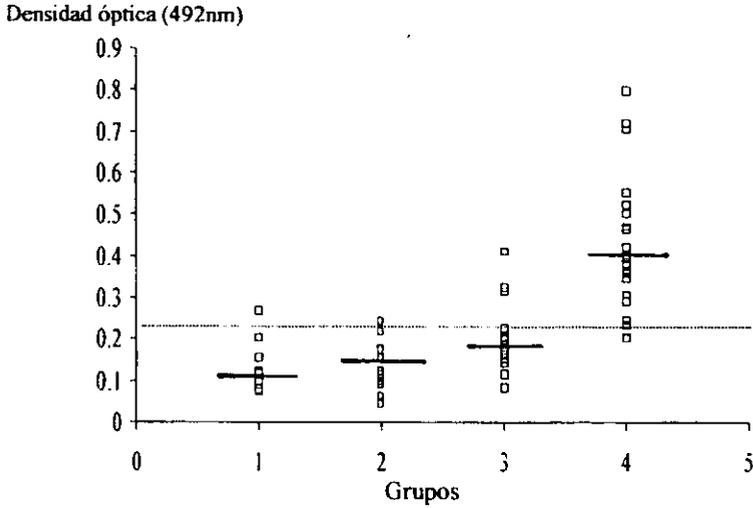


Figura 20. Densidad óptica de sueros utilizando al anticuerpo anti-IgG como antígeno. La gráfica nos muestra las diferentes lecturas en D.O a 492 nm, así como las medias de los diferentes grupos (1 cordón umbilical, 2 otros parásitos, 3 portadores asintomáticos y 4 AHA). Tomando como punto de corte la lectura de 0.233 tenemos una sensibilidad del 91.6 % y una especificidad del 88.3 % para detectar el AHA.

DISCUSION.

La amibiasis es una infección parasitaria de distribución cosmopolita causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*, aproximadamente el 10 % de la población mundial padece amibiasis (6). En México es un problema de salud pública, con una prevalencia del 4.49 % (70), lo que lo sitúa como uno de los países con mayor incidencia, tanto en su forma sintomática como asintomática, de aquí la importancia de realizar estudios de este parásito en nuestro país.

La amibiasis se define como la condición de hospedar *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas (4), estos parásitos se han aislado tanto en personas con la enfermedad activa como en portadores asintomáticos, las cepas son indistinguibles en su morfología. Se ha observado que presentan diferentes zimodemos (patrón enzimático), debido a ello se han denominado cepas patógenas, aquellas aisladas de pacientes con amibiasis y manifestaciones clínicas que presentan determinado patrón enzimático, en cambio las cepas aisladas de pacientes asintomáticos con un zimodemo determinado, son cepas no patógenas las cuales son incapaces de producir absceso hepático (10,12).

En México se aisló la cepa HMI:IMSS de *E. histolytica* a partir de un absceso hepático amibiano, esta cepa se ha utilizado mundialmente para el estudio de la amibiasis, por lo que decidimos utilizarla en este trabajo. Se sabe que al mantener los trofozoitos en medios de cultivo axénicos pierden patogenicidad y esta es recuperada al pasarlos por animales susceptibles a la enfermedad. Los trofozoitos utilizados en este estudio se inocularon en hámster por vena porta, con el fin de producir absceso hepático amibiano, así como recuperar del absceso los trofozoitos y cultivarlos en medio axénico complementado para utilizarlos en los diferentes experimentos, esto se realizó con el fin de asegurar la patogenicidad de las amibas utilizadas.

La caracterización de los componentes antigénicos de *E. histolytica* ha sido una de las metas principales en el estudio de este parásito. La identificación de tales antígenos es relevante

tanto para el mejoramiento de los métodos diagnósticos como para el análisis de la reacción inmune en el huésped y la posibilidad de inducir protección. Los primeros intentos para caracterizar la composición antigénica de *E. histolytica* no fueron muy halagadores debido a que las amibas eran cultivadas en presencia de bacterias del tracto intestinal o en asociación con otros protozoarios. Sin embargo, a partir de 1969 este tipo de estudios se facilitó por el desarrollo del cultivo axénico (20).

La identificación de los antígenos que participan directamente en la relación huésped parásito ha sido uno de los aspectos cruciales en trabajos realizados en *Entamoeba histolytica*. Para el estudio de estos antígenos amibianos se ha utilizado tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales; en 1987 se realizó la caracterización de una proteína de superficie de *E. histolytica* con características de lectina de 220 kDa con la ayuda de un anticuerpo monoclonal (8B₈) dirigido contra esta proteína (37). En 1989 se describió una adhesina de 112 kDa (17,32) y utilizando anticuerpos policlonales se determinó la importancia de la misma; también utilizando anticuerpos monoclonales se logró aislar y caracterizar un antígeno de superficie de 96 kDa en cepas patógenas de *E. histolytica* (48), otra proteína caracterizada con la ayuda de anticuerpos monoclonales fue la de 29 kDa (45).

Nuestro grupo decidió obtener un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra una glicoproteína de superficie de *E. histolytica*, ya que los antígenos de superficie de trofozoítos de *E. histolytica* son los primeros en ser reconocidos por el sistema inmune. La presencia e importancia de estos antígenos, ha sido demostrada por la inmovilización de los trofozoítos con suero inmune proveniente de pacientes con absceso hepático amibiano (AHA) (22,23). En contraparte el estudio realizado por De la Torre y col. (71) utilizando sueros de pacientes con AHA, encontró que los antígenos presentes en el citosol tienen una menor cantidad de determinantes antigénicos reconocidos por los sueros, que la de los antígenos de membrana plasmática, y de estos últimos la porción más antigénica correspondía a las glicoproteínas; se utilizó un extracto rico en glicoproteínas de superficie con el fin de obtener un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer una de las glicoproteínas de superficie de *E. histolytica*.

Las diferencias en el peso molecular de los antígenos reportados se debe principalmente a la metodología utilizada para la extracción del antígeno así como al tipo de cepa utilizada. Lo anterior fue reportado por Argüello al encontrar diferentes patrones electroforéticos en la obtención de un mismo extracto amibiano, por diferentes metodologías (28).

Existen reportes de diferentes antígenos inmunodominantes en pacientes con absceso hepático amibiano, como los antígenos de 125, 112, 170, 96, 90, 67, 56, 43, 35, 30, 29, 24 kDa entre otros (46, 72, 73, 74). En 1990 se reportó que los antígenos inmunodominantes en personas curadas que padecieron AHA, fueron los de: 8, 13, 18, 22, 29, 38, 45, 67 y 94 kDa (75), los antígenos reconocidos por madres embarazadas sin amibiasis fueron de 93, 133, 122 y 78 kDa (76). En nuestro trabajo encontramos que un antígeno de 66 kDa también es reconocido por los sueros de AHA.

El anticuerpo monoclonal que obtuvimos lo denominamos 4^cC₇, utilizando una IET se demostró que este anticuerpo reconoce una glicoproteína de 66 kDa. Este anticuerpo utilizó para caracterizar parcialmente a la glicoproteína de 66 kDa.

A través de inmunofluorescencia indirecta y DOT-ELISA con trofozoítos fijados, se demostró la presencia de esta glicoproteína (66 kDa) en la superficie de la amiba. Estas mismas técnicas se han utilizado para poner de manifiesto antígenos de superficie (17, 50, 39,77)

Para determinar la porción reconocida de la glicoproteína por el anticuerpo 4^cC₇, esta se trató con tripsina o metaperyodato de sodio. La porción proteica se degradó, catalizando con tripsina la hidrólisis de los enlaces peptídicos en los que el grupo carboxilo está dado por un residuo de lisina o arginina (78), la porción oligosacárida se eliminó con metaperyodato de sodio que actúa a nivel de grupos OH. Con estos tratamientos se determinó que la interacción antígeno (extracto de glicoproteínas) con el anticuerpo (4^cC₇) disminuye en un 64.7 % cuando se degrada la porción proteica y cuando se elimina la porción oligosacárida el reconocimiento disminuye en un 36.3 %, asegurando que nuestro anticuerpo monoclonal reconoce una glicoproteína, principalmente en su porción proteica y en menor grado la porción oligosacárida; este mismo proceso se utilizó para caracterizar antígenos de *E. histolytica*,

como la proteína de superficie de 29 kDa en la cual el anticuerpo monoclonal perdió la interacción con el antígeno tratado con tripsina pero no con metaperyodato de sodio (45). El ejemplo inverso es el del anticuerpo monoclonal 3H6 donde la interacción con el antígeno se ve afectada por el metaperyodato de sodio (46).

Los trofozoítos de *E. histolytica* presentan en su superficie glicoproteínas, las cuales contienen residuos de manosa o glucosa expuestos al exterior, esto se demostró al observar la unión de la lectina Concanavalina A a los trofozoítos amibianos y durante la purificación de glicoproteínas utilizando columnas con Concanavalina A (79,80), lectina que tiene especificidad para unir α -D-manosa y en menor grado α -D-glucosa y α -D-N-acetilglucosamina (81), con estos resultados podemos asumir que las glicoproteínas purificadas en esta forma presentan estos azúcares; sin embargo no podemos descartar la presencia de otros residuos de azúcares. Con esta información y ya que la interacción de nuestro anticuerpo monoclonal (4°C₇) con el antígeno se ve disminuida en un 36.3 % al eliminar azúcares, se realizaron inhibiciones con diferentes monosacáridos para determinar los que pudieran intervenir en el reconocimiento del antígeno con anticuerpo, encontrando que la glucosamina inhibió casi en un 30 % la unión del anticuerpo con el antígeno, resultado que sugiere que la glicoproteína de 66 kDa presenta en su estructura glucosamina.

La caracterización de los antígenos amibianos ha ayudado en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la interacción del trofozoito con el huésped, y los medios por los cuales este parásito puede invadir a distintos órganos como el hígado, esto está en relación a las propiedades de su membrana, tales como la capacidad de adherirse a células blanco, de lisar y de fagocitar indistintamente eritrocitos del grupo O, A o B (14, 82).

La adherencia y la fagocitosis se encuentran mediadas por diferentes antígenos de superficie. Se sabe que en la adhesión y fagocitosis pueden estar involucrados ligandos unidos a receptores específicos en la superficie celular. Se ha sugerido que hay una interacción entre las glicoproteínas de superficie de las células fagocíticas y los carbohidratos localizados en las partículas extrañas. Las lectinas tienen la propiedad de reconocer carbohidratos, por lo que permiten el aislamiento de componentes glicosilados en diferentes células (83).

La fagocitosis es el proceso mediante el cual se internalizan partículas, inicia con la interacción entre las moléculas de superficie de la célula fagocítica y la célula blanco. Los trofozoitos de *E. histolytica* se consideran células fagocíticas con la capacidad de internalizar diferentes partículas y células (15), y la fagocitosis se considera uno de los principales factores de virulencia de la amiba (14).

Nuestro anticuerpo monoclonal, reconoce una glicoproteína de superficie con peso molecular de 66 kDa, la cual es reconocida por sueros de AHA. Al realizar la inhibición de la fagocitosis con el anticuerpo monoclonal (4°C₇), se encontró que está era inhibida en un 26 %, demostrando que esta glicoproteína podría participar en el proceso de fagocitosis y esta de acuerdo con lo encontrado por el grupo de Vohra, en el que un anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno de 66 kDa proveniente de la cepa NIH:200 de *E. histolytica*, inhibe en un 50 % la fagocitosis (41). Existen otras moléculas que participan en el proceso de fagocitosis como la lectina de 220 kDa (37) y la adhesina de 112 kDa (32,32,38) previamente descritas.

Uno de los mayores problemas que existen en el estudio de la amibiasis ha sido la obtención y caracterización de los antígenos relevantes. Este problema se debe en parte a que la amiba contiene un gran cantidad de proteasas lo que ocasiona la degradación de los antígenos amibianos aún en presencia de inhibidores de proteasas, además del bajo rendimiento en la obtención de antígenos. Esto ha ocasionado buscar nuevas estrategias para la obtención de estos antígenos.

Una forma de obtener antígeno amibiano sin extraerlo de los trofozoitos, es obteniendo la imagen interna de éste. Los antígenos provocan una respuesta en la que hay producción de anticuerpos (Ab1) con un idiotipo determinado, capaces de reconocer al antígeno; estos anticuerpos a su vez pueden inducir la producción de anticuerpos anti idiotipo (Ab2), los cuales tienen la característica de presentar (Ab2 β) o no (Ab2 α , Ab2 γ) la imagen interna del antígeno (53,54).

Otros estudios han utilizado los anticuerpos Ab2 como una posible vacuna. Los anticuerpos Ab2 que expresan la imagen interna del antígenos provenientes de: *Schistosoma mansoni*, *Candida albicans* y *Haemophilus influenzae* (60,56,57), han conferido inmunidad activa, en modelos experimentales contra las enfermedades causadas por estos patógenos. Los anticuerpos Ab2 también han sido utilizados como antígeno para el diagnóstico de la cisticercosis bovina, en la que se obtuvo un anticuerpo anti idiotipo con la imagen interna del antígeno que les permitió diagnosticar esta enfermedad (62).

Nosotros obtuvimos un anticuerpo anti – idiotipo (Ab2), a partir del anticuerpo monoclonal 4°C7. De acuerdo a la clasificación de los anticuerpos Ab2, basada en sus características físicas relacionadas al sitio de unión del antígeno y a los resultados obtenidos en este trabajo se demostró que nuestro anticuerpo anti – idiotipo es un anticuerpo Ab2β (imagen interna del antígeno), ya que la unión del anticuerpo monoclonal (Ab1) con el anticuerpo anti – idiotipo se inhibió en un 50 % por el antígeno.

Los anticuerpos Ab2β inducen la producción de anticuerpos Ab3, que al igual que los Ab1 reconocen el antígeno original. Al inmunizar un conejo con nuestro anticuerpo Ab2 obtuvimos anticuerpos Ab3 con la capacidad de reconocer a la glicoproteína de 66 kDa, con lo que confirmamos que nuestro anticuerpo anti – idiotipo contiene la imagen interna del antígeno.

Se han realizado diferentes estudios en la amibiasis, utilizando anticuerpos monoclonales, antígenos puros o mezcla de ellos para el diagnóstico de diferentes entidades clínicas de la enfermedad. En 1994 se publicó un trabajo que utilizó el anticuerpo monoclonal (20/7D), para detectar el trofozoito de *E. histolytica* en heces de pacientes con disentería, con una sensibilidad del 87 % y una especificidad del 100 % (51). Utilizando también anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno de 170 kDa se pudo detectar en heces trofozoitos de *E. histolytica* con una sensibilidad del 93 % y una especificidad del 95 % comparada con el cultivo de trofozoitos.

Utilizando nuestro anticuerpo Ab2β que expresa la imagen interna del la glicoproteína de 66 kDa que tiene importancia en el proceso de fagocitosis, determinamos que este era capaz de diferenciar entre los sueros de AHA, portadores asintomáticos, infectados con otros parásitos y

del cordón umbilical (testigo negativo). Los resultados muestran que al utilizar al anticuerpo Ab2 β como antígeno y tomando como punto de corte una densidad óptica de 0.233 podemos diferenciar los sueros de AHA, de los de portadores asintomáticos, infectados con otros parásitos y controles negativos. Con una sensibilidad del 91.9 % y una especificidad del 88.3%.

Utilizado antígenos puros como el de 170 kDa se ha podido diferenciar entre sueros de colitis amibiana, portadores asintomáticos y personas sanas, teniendo una sensibilidad del 94 % especificidad del 90 % (84, 85). También se ha ocupado como antígeno extracto de *E. histolytica* para discernir entre los sueros de AHA, disentería amibiana y personas sanas, obteniendo una especificidad del 100% y una sensibilidad del 89.5 % en pacientes con AHA (86), sin embargo la desventaja es la degradación de los antígenos por las proteasas y el bajo rendimientos de estos, esto se ha solucionado en parte mediante el uso de proteínas recombinantes en el diagnóstico de la amibiasis invasiva, por ejemplo la proteína recombinante del antígeno de 170 kDa en el diagnóstico de amibiasis invasiva obtuvo una sensibilidad del 90 % la cual es más baja que cuando se utiliza el antígeno purificado del trofozoito, esto se pudo deber a que son proteínas recombinantes y en ellas no se obtiene la porción oligosacárida del antígeno que es reconocida por los sueros, lo que pudiera ocasionar que no sea reconocida por todos los sueros (87).

En contraste al utilizar los anticuerpos anti idiotipo que expresan la imagen interna del antígeno se evita este problema ya que nuestro anticuerpo reconoce las porción proteica y oligosacárida del antígeno, y esta es la imagen tanto proteica como oligosacárida de éste en los distintos sueros, lo cual sería una ventaja sobre la utilización de las proteínas recombinantes las cuales no presentan la porción oligosacárida de las glicoproteínas. Aunado a esto la sensibilidad y especificidad que se obtuvo fue buena.

Por lo anterior podemos inferir que la producción del anticuerpos anti – idiotipo es una buena alternativa para contar con la imagen del antígeno, sin necesidad de purificarlo, conociendo que el alto contenido de proteasas presentes en la amiba dificulta la purificación y

caracterización de antígenos amibianos así como su mantenimiento, además de ser un buen candidato para el diagnóstico del AHA.

De igual manera cabe la posibilidad de investigar si nuestro anticuerpo anti idiotipo ($Ab2\beta$) pudiera conferir protección al hámster y evitar en éste la formación de absceso hepático amibiano posterior a la administración del trofozoito, en dado caso podría considerarse como un buen candidato para su empleo como vacuna.

CONCLUSIONES.

En este trabajo obtuvimos un anticuerpo monoclonal (4°C₇) con capacidad de reconocer un antígeno de superficie de *Entamoeba histolytica*.

El antígeno se expresa en la superficie del trofozoito de *E. histolytica*, es una glicoproteína con peso molecular de 66 kDa, que en su porción oligosacárida contiene principalmente glucosamina.

La glicoproteína de 66 kDa puede inhibir la fagocitosis en un 26 %, por lo que se encuentra involucrada en el proceso de fagocitosis, probablemente la interacción que existe entre la glicoproteína y el eritrocitos sea una interacción tipo lectina.

A través de la producción de anticuerpos anti – idiotipo, utilizando el anticuerpo Ab2β con la imagen interna de este antígeno, se pudo diferenciar entre los sueros de AHA de los sueros de cordón umbilical, infectados con otros parásitos y portadores asintomáticos, con una sensibilidad del 91.6 % y una especificidad del 88.3 % tomando como punto de corte una lectura de 0.233 en D.O. Por lo que lo hace un buen candidato para el diagnóstico de AHA.

Lo anterior abre la posibilidad del empleo del anticuerpos anti–idiotipo (Ab2β) como antígeno en el diagnóstico del absceso hepático amibiano, incluso tratar de conferir protección utilizando este modelo contra este parásito.

BIBLIOGRAFIA.

1. Beck, JW. and Davies, JE. *Parasitología Médica*. 3a. ed. Ed. Interamericana. Méx. 1984. pp. 9 - 12.
2. Martínez PA. The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitol. Today*. 1987. 3: 111 – 118.
3. Martínez PA. The biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press/Wiley, Chichester, 1982.
4. Bos, H.J. The problem of pathogenicity in parasitic *Entamoeba*. *Acta Leidensia*. 1973. 40 :1
5. Boletín Epidemiológico, Jefatura Atención Primaria de la Salud, Dirección General Médica. I.M.S.S. México 1987.
6. Said-Fernández S. Factores de virulencia de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med*. 1990. 21: 253 – 262.
7. Hamelmann C., Urban B., Foerster B. and Horstmann R.D. Complement resistance of pathogenic *Entamoeba histolytica* mediated by trypsin – sensitive surface component(s). *Infect. Immun*. 1993. 61: 1636 – 1640.
8. Ravdin JI. *Entamoeba histolytica* : from adherence of enteropathy. *J. Infect. Dis*. 1989. 159 : 420 – 429.
9. Bhatti HS., Bhushnurmath S., Mahajan RC., Ganguly NK. And Sehgal R. An experimental model of ameboma in guinea pig. *Exp. Parasitol*. 1992. 74 : 283 – 289.
10. Sargeant PG., Williams JE. and Grene J D. The differentiation of invasive and noninvasive *Entamoeba histolytica* by isozyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 1978. 72 : 519 – 521.
11. Reed SL., Keene WE. and McKerrow JH. Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin. Microbiol*. 1989. 27 : 2772 – 2777.
12. Clark CG, Cunnick CC. And Diamond LS. *Entamoeba histolytica*: Is conversion of “nonpathogenic” amebae to the “pathogenic” form a real phenomenon?. *Exp. Parasitol*. 1992. 74 : 307 – 314.

13. Clark CG. and Diamond LS. *Entamoeba histolytica*: An explanation for the reported conversion of "nonpathogenic" amebae to the "pathogenic" form. *Exp. Parasitol.* 1993. 77 : 456 – 460.
14. Trissl D., Martínez-Palomo A., De La Torre M., De La Hoz R. and Pérez E. Surface properties of *Entamoeba*: Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J. Exp. Med.* 1978. 148 : 1137 – 1145.
15. Orozco E., Guameros G., Martínez-Palomo A. and Sánchez T. *Entamoeba histolytica*: Phagocytosis as a virulence factor. *J. Exp. Med.* 1983. 158 : 1511 – 1521.
16. Herrera VD., Espinosa CM. and Martínez-Palomo A. Erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 1997. 28 (Suppl.): 197 – 199.
17. Arroyo R. and Orozco E. Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1987. 23 : 151 – 158.
18. Krupo, IM. Immunoelectrophoretic analysis of several strains of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1966. 15 : 849 – 854.
19. Maddison SE., Powell SJ. and Elsdondew R. Comparison of hemagglutinins and precipitins in amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1965. 14 : 551 - 555.
20. Diamond, LS. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science.* 1961. 134 : 336 - 337.
21. Thopson PE., Graedel SK. and Schneider CR. Preparation and evaluation of standardized antigen from axenic cultures of *Entamoeba histolytica*. *W.H.O.* 1968. 34 : 349 - 365.
22. Beltran F., Biagi F., Ortega PS.. Observaciones sobre la reacción de inmunofluorescencia y la reacción de inmovilización con *Entamoeba histolytica*. *Rev. Gastr. Méx.* 1965. 30 : 491 - 496.
23. Biagi R. and Buentello I. Immobilization reaction for diagnosis of amebiasis. *Exp. Parasitol.* 1961. 11 : 188 - 190.
24. Boonkpucknaving S. and Nair RC. Serological diagnosis of amebiasis by immunofluorescence. *J. Clin. Path.* 1967. 20 : 875 - 878.
25. Calderon J., Muñoz ML. and Acosta HM. Surface redistribution and released of antibody-induced caps in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Med.* 1980. 151 : 184 - 193.
26. Calderon J. and Tovar GR. Loss of susceptibility to antibody and complement mediated lysis in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med.* 1980. suppl 1 : 241 - 244.
27. Huldt G.D. and Allison AC. Interactions between *Entamoeba histolytica* and complement. *Nature.* 1979. 227 : 214 - 216.

28. Argüello GR, Sánchez GM, Garduño G, Valadez S, Martínez G, Muñoz O, y Ortega P. Evaluación de una metodología de inmunoblot para la detección de antígenos relevantes de *Entamoeba histolytica* por anticuerpos inducidos en la amibiasis humana. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 1990, 21 : 3 -9.
29. Talamás-Rohana P. and Meza I. Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: Substratum degradation and changes in cytoskeleton organization. J. Cell. Biology. 1988. 106 : 1787 – 1794.
30. Reed SL., and Gigli I. Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. J. Clin. Invest. 1990. 86 : 1815 – 1822.
31. Garcia RG, Gonzalez RA, y Orozco E. Localización subcelular y caracterización bioquímica de la adhesina de 112 Kd en *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 1990: 21 : 75-80.
32. Rigotherier MC., Gracia R., Guaderrama M. and Orozco E. Purification and functional characterization of the 112 kDa adhesin of *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 1992. 23 : 239 -241.
33. Ruoslahti E. and Obrink B. Common principles in cell adhesion. Exp. Cell Res. 1996. 227 : 1- 11.
34. McCoy JJ., Mann B J. and Petri J.K. Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or How lectins let parasites stick around. Infect. Immun. 1994. 62 : 3045 – 3050.
35. Ginny SC., Kain KC, Abd-Alla M., Jackson TF and Ravdin JI. A recombinant cysteine-rich section of the *Entamoeba histolytica* galactose inhibitable lectin is efficacious as a subunit vaccine in the gerbil model of amebic liver abscess. J. Infect. Dis. 1995. 171 : 645 – 651.
36. Ivann BJ, Chung, CY, and Dodson JM. Neutralizing monoclonal antibody epitopes of the *Entamoeba histolytica* galactose adhesin map to the cysteine-rich extracellular domain of the 170 kDa subunit. Infect. Immun. 1993. 61 : 1772 - 1778.
37. Adams SA., Robson SC., Gathiram V, Jackson T.F., Pillay T.S., Kirsch R.E. and Makgoba M.W. Immunological similarity between the 170 kDa amoebic adherence glycoprotein and human $\beta 2$ integrins. Lancet. 1993. 341 : 17 - 19.
38. Garcia-Rivera G., Arroyo R., Mena R., Luna J. and Orozco E. Involvement of the 112 kDa adhesin in *Entamoeba histolytica* phagocytosis. Arch. Med Res. 1997. 28 (Suppl) : 166 – 167.

39. Meza I., Cázares F., Rosales-Encina J., Talamás-Rohana P. and Rojkind M. Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 1987. 156 : 798 – 805.
40. Rosales-Encina JL., Meza I., López-De-León A., Talamás-Rohana P. and Rojkind M. Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 1987. 156 : 790 – 797.
41. Vohra H., Kaur S., Ganguly NK. and Mahajan RC. Inhibition of adhesin by monoclonal antibody to 66 kDa surface antigen of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 1992. 23 : 235–237.
42. Ravdin I. Torian B. and Jackson T. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with recombinant *Entamoeba histolytica* 29 kDa antigen. *Infect. Immun.* 1995. 63 : 472 - 477.
43. Flores B., Reed S., Ravdin J and Torian B. Serologic reactivity to purified recombinant and native 29 kDa peripheral membrane protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 1993. 31 : 1403 - 1407.
44. Analysis of genomic sequence encoding the 29 kDa cysteine rich protein of *Entamoeba histolytica*. *Trop. Med. Parasitol.* 1993. 44 : 116 – 118.
45. Shandil RK. and Vinayak VK. Immunochemical characterisation of a 29 kda surface associated molecule of *Entamoeba histolytica* and its recognition by serum from patients with amoebiasis. *J. Med. Microbiol.* 1992. 36 : 41 – 45.
46. Agundis-Mata C., Blanco F., Toledo J., Reta F., Kumate J. And Isibasi A. Identification of a 35 kDa glycoprotein from *Entamoeba histolytica* by sera from patients with amoebic liver abscess and with mouse monoclonal antibody. *Immunol. Invest.* 1996. 25 : 519 – 529.
47. Agundis, MC. Isibasi, A. Ortiz, V. Reyes JL., Paniagua J., Ramirez A. and Kumate J. Obtención de anticuerpos monoclonales contra glicoproteína de membrana externa de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*. 1990, 21 : 15 - 22.
48. Torian BE., Reed SL., Flores BM., Creely CM., Coward JE., Vial K. and Stamm WE. The 96-kilodalton antigen as an integral membrane protein in pathogenic *Entamoeba histolytica*: Potential differences in pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infect. Immun.* 1990. 58 : 753-760.

49. Ravdin JI. and Guerrant RL. Role of adherence in cytopathic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. 1981. J. Clin. Invest. 68 : 1305 – 1313.
50. Bracha R., Nuchamowitz Y. and Mirelman D. Molecular Cloning of a 30 –kilodalton lysine-rich surface antigen from a nonpathogenic *Entamoeba histolytica* strain and its expression in a pathogenic strain. Infect Immun. 1995. 63 : 917 – 925.
51. Gozález-Ruiz A. Haque R., Rehman T., Aguirre A., Hall Andrew, Guhl Felipe, Warhurst David and Miles Michael. Diagnosis of amebic dysentery by detection of *Entamoeba histolytica* fecal antigen by invasive strain-specific, monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 1994. 32 : 964 - 970
52. Sherchand JB., Thammapalerd N. Riganti M., Tharavanij S. and Punpoowong B. Monoclonal antibody - based immunohistochemical demonstration of *Entamoeba histolytica* in liver tissues of experimentally infected hamster. Int. J. Parasitol. 1994. 24 : 909 - 916
53. Greenspan NS. and Bona C. Idiotypes: structure and immunogenicity. FASEB. 1993. 7 : 437 – 444.
54. Cheng HL, Sood Ashwani, Ward Ronald, Kieber-Emmons Thomas and Kohler Heinz. Structural basis of stimulatory anti-idiotypic antibodies. Mol. Immunol. 1988. 25 : 33 – 40.
55. Gulati S., McQuillen DP., Sharon J. and Rice P. Experimental immunization with monoclonal anti – idiotope antibody that mimics the *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide epitope 2C7. J. Infect. Dis. 1996. 174 : 1238 – 1248.
56. Polonelli L., Bernardis F., Conti S., Boccanera M., Gerloni M., Morace G., Magliani W., Chezzi C. and Cassone A. Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. J. Immunol. 1994. 152 : 3175 – 3182.
57. Reason DC., Kitamura M. and Lucas A. Induction of a protective human polysaccharide-specific antibody response in hu-PBL SCID mice by idiotypic vaccination. J. Immunol. 1994. 152 : 5009 – 5013.
58. Uemura H., Beniers A., Okajima E., Debruyne F., and Oterwijk E. Vaccination with anti-idiotypic antibodies mimicking a renal cell carcinoma – associated antigen induces tumor immunity. Int. J. Cancer. 1994. 58 : 555 – 561.

59. Sacks DL., Kirchhoff LV., Hieny S. and Sher A. Molecular mimicry of a carbohydrate epitope on a major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* by using anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.* 1985. 135 : 4155 – 4162.
60. Nyindo M., Borus PK., Farah IO., Oguya O. and Makawiti. *Schistosoma mansoni* in the baboon: Modulation of pathology after vaccination with polyclonal anti-idiotypic antibodies. *Scand. J. Immunol.* 1995. 42 : 637 – 643.
61. Mitchell GF., Garcia EG. and Cruis KM. Competitive radioimmunoassays using hybridoma and anti – idiotypic antibodies in identification of antibody responses to and antigens of, *Schistosoma japonicum*. *Aust. J. Exp. Biol. Med.* 1983. 61 : 27 – 36.
62. Hayunga EG., Sumner M., Duncan J., Chakrabarti E. and Webert D. Production of anti-idiotypic antibodies as potential immunoreagents for the serological diagnosis of bovine cysticercosis. *Annals N. Y. Academy of Sciences.* Pp. 178 – 183.
63. Bradford M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem.* 1976. 72 : 248 - 254.
64. Kohler G. and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975. 256 : 495 - 497.
65. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. 227 : 680 - 685.
66. Towbin H. Staechelin T. Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Sci USA.* 1979. 76 : 4350 - 4354.
67. Bracha R. Nuchamowitz Y. and Mirelman D. Molecular cloning of 30-kilodalton lysine-rich surface antigen from a nonpathogenic *Entamoeba histolytica* strain and its expression in pathogenic strain. *Infect. Immun.* 1995. 63 : 917 - 925.
68. Das P. Sengupta K., Pal S., Das D. and Pal S. C. Biochemical and immunological studies on soluble antigens of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.* 1993. 79 : 365 – 371.
69. Chávez Rueda K., Agundis Mata C., Cervera H., Zenteno E., Muñoz O. and Blanco F. Identification of an idiotypic epitope on mouse monoclonal antibody directed to a 35 kDa glycoprotein from *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 1997. 28 (Suppl.) 242 – 244.

70. González C.R., Isibasi A., Ortiz N.V., Paniagua J., Garcia J. A., Ramirez A., Salvatierra B., Tapia R., Gutiérrez G. and et. al. Prevalence of antibodies against *Entamoeba histolytica* in Mexico measured by ELISA. *Epidemiol. Infect.* 1995. 115 : 535 – 543.
71. De La Torre P., Ortiz OL. and Lamoyi E. Carbohydrate epitopes of *Entamoeba histolytica* cell surface glycoproteins are major targets of human humoral response. *Acta. Trop.* 1995. 60 : 59 – 71.
72. Linder E., Lundin L., Haglund S., Hallender H. and Tellez SA. Identification of a parasite-specific cytoplasmic 67 kDa *Entamoeba histolytica* antigen recognized by patient sera and monoclonal antibodies. *Arch. Med. Res.* 1992. 23 : 169 – 172.
73. Lopez LR., Jimenez DB., Canto OL and Chavez DL. Variation of proteins and proteinases in *Entamoeba histolytica* lysates containing a protease inhibitor. *Arch. Med. Res.* 1992. 23: 87-89.
74. Edman U., Meraz MA., Rausser S, Agabian N. and Meza I. Characterization of an immunodominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 1990. 172 : 879 – 888.
75. Shandil R.K., Vinayak V.K. Immunoreactivity of *Entamoeba histolytica* antigens with sera from amoebic patients. *Med. Microbiol. Immunol. Berl.* 1990. 179 : 263 – 269.
76. Aguirre CL., López RR., Zacapa E., Martínez C. and Muñoz O. Specific antiamebic serum antibodies in mexican puerperae and their newborns. *Adv.Mucosal Immunol.* 1995. pp 949 – 952.
77. Tachibana H., Kobayashi S., Kato Y., Nagakura K., Kaneda Y. and Takeuchi T. Identification of a pathogenic isolate-specific 30,000 Mr antigen of *Entamoeba histolytica* by using a monoclonal antibody. *Infect Immun* 1990 58 : 955 – 960
78. Lehninger A. Nelson D. and Cox M. *Principios de Bioquímica*. 2ª. ed. Ed. Ediciones Omega, S.A. Barcelona 1993 pp 150 – 151.
79. Joyce P. and Ravdin JI. Antigens of *Entamoeba histolytica* recognized by immune sera from liver abscess patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988. 38 : 74 – 80.
80. Aley SB., Scott WA. and Cohn ZA. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 1980. 152 : 391 – 404.

81. Robledo Y., Madrid JF., Leis O. and Cajaraville MP. Analysis of the distribution of glycoconjugate in the digestive gland of the bivalve mollusc. *Mytilus galloprovincialis* by conventional and lectin histochemistry. *Cell Tissue Res.* 1997. 28 : 591 – 602.
82. Ravdin JI. and Guerrant RL. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian Tissue culture cell and human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 1981. 68 : 1305 – 1313.
83. Nathan S. and Halina L. Lectins as cell recognition molecules. *Science.* 1989. 246 : 227 – 234.
84. Abd-Alla M., Jackson T., Gathiram V, El-Hawey A. and Ravdin J. Diferentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* infections from nonpathogenic infections by detection of galactose inhibitable adherence protein antigen in sera and feces. *J. Clin. Microbiol.* 1993. 31 : 2845 – 2850.
85. Abd-Alla M., El-Hawey A. and Ravdin J. Use an enzyme-linked immunosorbent assay to detect anti-adherence protein antibodies in sera of patients with invasive amebiasis in Cairo, Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1992. 47 : 800 – 804.
86. Baveja U. F., Roy T., Kaur M., Kulpati DD. and Aggarwal S. K. Dot immunobinding assay versus sandwich ELISA in diagnosis of invasive amoebiasis. *Indian. J. Med. Res.* 1991. 93 : 161 - 165.
87. Zhang Y., Li E., Jackson T F., Zhang T., Gathiram Vinodh and Stanley SL. Use of a recombinant 170-kilodalton surface antigen of *Entamoeba histolytica* for serodiagnosis of amebiasis and identification of immunodominant domains of the native molecule. *J. Clin Microbiol.* 1992. 30 : 2788 – 2791.