



Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas
e Ingeniería

Desarrollo de una prueba inmunodiagnóstica (ELISA) utilizando anticuerpos policlonales monoespecíficos contra la peroxirredoxina de Entamoeba histolytica (Ehp29)

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

P R E S E N T A

Q.F.B. EVA VIVIANA SARMIENTO GUTIERREZ

Tijuana, Baja California.

Abril del 2012.

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 072

Tijuana, B. C., a 23 de marzo de 2012

C. Eva Viviana Sarmiento Gutiérrez
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la

Opción TESIS

Es propuesto, por el C. Dr. Samuel Guillermo Meléndez López

quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al tema Desarrollo de una prueba inmunodiagnóstica (ELISA) utilizando anticuerpos policlonales monoespecificos contra la peroxirredoxina de Entamoeba histolytica (Ehp29)

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:


- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- JUSTIFICACION
- III.- OBJETIVOS
- IV.- MATERIALES Y METODOS
- V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES
- VI.- CONCLUSIONES
- VII.- REFERENCIAS
- VIII.- ANEXOS


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA


Q. Noemí Hernández Hernández
Sub-Director Secretario


Dr. Samuel Guillermo Meléndez López
Director de Tesis


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

“Basta un poco de espíritu aventurero para estar siempre satisfechos, pues en esta vida, gracias a Dios, nada sucede como deseábamos, como suponíamos, ni como teníamos previsto”...

Para Víctor Manuel y Eva Delia,
por tener el privilegio de ser su hija...

AGRADECIMIENTOS

A Dios. A mi familia.....

A mis hermanas, Janeth y Joana, por estar siempre ahí, por hacerme tía, por ser mis hermanas, las amo.....

Al Dr. Marco A. Ramos y al Dr. Samuel G. Meléndez, por compartirme su conocimiento y experiencia, por sus consejos y el tiempo dedicado. GRACIAS! por permitirme ser su alumna.....

A la Dra. Rosy Mares y Dr. Manuel Cornejo, por el apoyo y consejos dados.....

Al Dr. Guillermo R. Ventura, mi amigo, a la Dra. Araceli por hacerme sentir su apoyo y a Paty Ramírez la mejor secretaria de posgrado.....

A mis compañeros de clase y laboratorio de Biotecnología que enriquecieron e hicieron mas placentero mi tiempo de estudio.....

El presente trabajo de investigación fue realizado en el
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA
de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

Bajo la Dirección del
DR. SAMUEL GUILLERMO MELÉNDEZ LÓPEZ
y la Asesoría del
DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA

Financiado por la Coordinación de Posgrado e Investigación de la UABC a través
de la 12^a Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación
(Otorgado al Dr. Samuel Guillermo Meléndez-López)

Tabla de contenido

Índice de Figuras	4
Índice de Tablas	5
Abreviaturas	6
I. INTRODUCCION	8
I.1 Amebiasis y <i>Entamoeba histolytica</i>	8
I.1.1 Epidemiología.....	9
I.1.2 Ciclo de vida	9
I.1.3 Patología	11
I.1.4 Factores de virulencia	11
I.1.5 Peroxiredoxina (<i>Ehp29</i>) amebiana.....	14
I.1.6 Peroxirredoxina (<i>Ehp29</i>) como factor de virulencia.....	15
I.2 Métodos de diagnóstico de amibiasis	15
I.2.1 Microscopía	15
I.2.2 Cultivos de amibas.....	16
I.2.3 Análisis de isoenzimas.....	16
I.2.4 PCR.....	17
I.2.5 Pruebas de detección de anticuerpos	18
I.2.6 Pruebas de detección de antígeno	20
II. JUSTIFICACION	22
III. OBJETIVOS	24
III.1 Objetivo general.....	24
III.2 Objetivos específicos	24
IV. MATERIALES Y METODOS	25
IV.1 Reactivos químicos y biológicos	25
IV.1.1 Plásmidos	25
IV.1.2 Células y medios.....	25
IV.1.3 Anticuerpos.....	26
IV.1.4 Reactivos químicos.....	26
IV.2 Equipo	26
IV.3 Expresión y purificación de <i>Ehp29</i> recombinante.....	27
IV.3.1 Expresión	27
IV.3.2 Purificación.....	27
IV.4 Obtención de anticuerpos policlonales anti- <i>Ehp29</i>	28

IV.4.1 Esquema de inmunización	28
IV.4.2 Obtención de suero hiper-inmune	28
IV.4.3 Inmunoensayo tipo <i>ELISA</i> indirecto	29
IV.5. Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>Ehp29</i>	30
IV.5.1 Preparación de la resina <i>Sepharose</i> [®] -4B acoplada a proteínas bacterianas	30
IV.5.2 Preparación de la resina <i>Sepharose</i> [®] -4B acoplada a <i>Ehp29</i>	31
IV.5.3 Procedimiento de purificación de anticuerpos anti- <i>Ehp29</i>	31
IV.6 Caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>Ehp29</i>	32
IV.6.1 Evaluación de la especificidad contra antígeno recombinante	32
IV.6.2 Evaluación de la especificidad contra antígeno nativo	33
IV.7 Precipitación de anticuerpos anti- <i>Ehp29</i> con sulfato de amonio	34
IV.8 Preparación del anticuerpo anti- <i>Ehp29</i> de reconocimiento directo	35
IV.9 Inmunoensayo tipo <i>ELISA</i> directo con anticuerpo de captura anti- <i>Ehp29</i>	36
IV.9.1 Eficiencia contra antígeno recombinante	36
IV.9.2 Titulación de antígeno recombinante	37
IV.9.3 Límite de detección de antígeno nativo	38
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	39
V.1 Expresión y purificación de <i>Ehp29</i> recombinante	39
V.2 Obtención y titulación de suero hiper-inmune anti- <i>Ehp29</i>	40
V.3 Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>Ehp29</i>	41
V.4 Caracterización de anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>Ehp29</i>	41
V.5 Preparación de IgG anti- <i>Ehp29</i> acoplada a biotina	44
V.6 Evaluación del inmunoensayo de <i>ELISA</i> de captura anti- <i>Ehp29</i>	45
V.7 Aplicación del inmunoensayo tipo <i>ELISA</i> de captura anti- <i>Ehp29</i> en la detección antígeno recombinante nativo	45
V.8 Comparación del inmunoensayo tipo <i>ELISA</i> de captura anti- <i>Ehp29</i> con estuches comerciales	46
VI. CONCLUSIONES	48
VII. REFERENCIAS	49
VIII. ANEXOS	55

Índice de Figuras

Figura 1. Representación grafica de los diferentes estadios de <i>E. histolytica</i>	10
Figura 2. Separación electroforética (SDS-PAGE al 12%) de las fracciones de purificación de <i>Ehp29</i> recombinante.	39
Figura 3. Producción de anticuerpos policlonales anti- <i>Ehp29</i>	40
Figura 4. Análisis de la especificidad de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>Ehp29</i> contra antígeno recombinante	42
Figura 5. Análisis de especificidad de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>Ehp29</i> contra antígeno nativo.....	43
Figura 6. Determinación de los límites de detección de antígeno nativo en extractos celulares de <i>E. histolytica</i> mediante un análisis densitométrico.....	44
Figura 7. Detección de antígeno mediante el inmunoensayo tipo <i>ELISA</i> de captura de anti- <i>Ehp29</i>	46

Índice de Tablas

Tabla 1. Pruebas serológicas comerciales disponibles para el diagnóstico de amibiasis.....	19
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen <i>Ehp29</i>	25
Tabla 3. Características generales del ensayo para la titulación del suero hiper-inmune.	28
Tabla 4. Condiciones de reconocimiento para la caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>Ehp29</i> contra antígeno recombinante.	33
Tabla 5. Condiciones de reconocimiento para la caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>Ehp29</i> contra antígeno nativo.	34
Tabla 6. Eficiencia del inmunoensayo tipo <i>ELISA</i> directo con anticuerpo de captura anti- <i>Ehp29</i> contra antígeno recombinante.	36
Tabla 7. Diluciones de <i>Ehp29</i> en el ensayo de <i>ELISA</i> directo con anticuerpo de captura.....	37

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
A _{nm}	Absorbencias a diferente longitud de onda (500, 415 y 280)
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
anti- <i>Eh</i> Perox	Anti-Peroxirredoxina de <i>E. histolytica</i>
BL	Muestra de sangre total obtenida de manera secuencial
BSA	Albúmina de suero bovina
C3a	Anafilotoxina del complemento
C5a	Anafilotoxona del complemento
Ca ⁺⁺	Calcio ²⁺
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. dispar</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
E ₁ ...E _n	Fracción cromatográfica eluida
<i>Eh</i> CP1, <i>Eh</i> CP2, <i>Eh</i> CP5	Cisteína proteinasas de <i>E. histolytica</i>
<i>Ehp</i> 29	Peroxirredoxina de <i>E. histolytica</i>
<i>ELISA</i>	Del ingles <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Antibody</i>
<i>et al.</i>	Del latín “ <i>et allos</i> ” : y colaboradores
Fc	Fragmento cristalizable o constante en las Inmunoglobulinas
FNP	Fracción No Pegada
FR	Fracción obtenida después de cargar buffer de refoldeo en la cromatografía
g, mg, µg, ng	Gramos, miligramos, microgramos y nanogramos
Ig	Inmunoglobulina
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
K ⁺	Potasio
K _a	Constante de asociación
KDa	Kilo Daltons
L, mL, µL	Litros, mililitros, microlitros
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LT	Lisado total

M, mM, μ M	Molar, milimolar, micromolar
h, min	Horas, minutos
Na ⁺	Sodio
Nm	Nanómetros
No.	Número
OD	Unidades de densidad óptica
PCR	Del Inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PM	Peso Molecular
Rpm	Revoluciones por minuto

I. INTRODUCCION

I.1 Amebiasis y *Entamoeba histolytica*

La amebiasis se define como la infección intestinal o extraintestinal causada por el parásito protozooario *Entamoeba histolytica*. Clínicamente, es una de las causas de disentería, colitis y otras enfermedades invasivas, tales como absceso hepático amibiano, infecciones del sistema respiratorio, y amebiasis genitourinaria, entre otras.

E. histolytica fue descrita por primera vez en 1875. Ese año, Lösch observó en las heces de un paciente con disentería unas formas móviles, a las que llamo *Amoeba coli* [González-Ruiz *et al.*, 1994]. Posteriormente, en 1903, Schaudin se refirió al microorganismo que causaba disentería como *E. histolytica*, y Craig como *E. dysenteriae*. Pero fue Brumpt, en 1925, quien sugirió que los humanos podrían ser infectados por dos especies de *Entamoeba* morfológicamente idénticas, que diferían en su capacidad patógena: *E. dysenteriae*, especie patógena (invasiva); y *E. dispar*, especie no patógena (no invasiva) [Diamond y Clark, 1993; WHO, 1997].

La hipótesis de Brumpt no fue considerada relevante por muchos años. Sin embargo, un reporte publicado en 1979 distingue dos grupos diferentes de *E. histolytica*, basado en su patrón isoenzimático y el origen de la muestra clínica, apoyando a la hipótesis de dos especies de *Entamoeba* morfológicamente idénticas [Sargeant y Williams, 1979]. Posteriormente, se fueron sumando resultados de múltiples análisis bioquímicos, genéticos e inmunológicos. Finalmente, el debate fue resuelto y en 1997, la OMS reconoció la existencia de dos organismos diferentes: *E. histolytica*, capaz de invadir la mucosa intestinal y otros tejidos, y *E. dispar*, una especie no patógena [Diamond y Clark, 1993; WHO, 1997].

Un nuevo debate ha surgido: *E. dispar* exhibe un moderado efecto citopático sobre monocapas de células epiteliales [Espinosa-Cantellano *et al.*, 1998]. Aun más, recientemente se reportaron casos aislados de pacientes infectados con *E. dispar* que presentaban síntomas intestinales [Visser *et al.*, 2006]; adicionalmente, mediante estudios de amplificación molecular, se identificaron fragmentos de ADN aparentemente de *E. dispar*, a partir de muestras de aspirados hepáticos. Estas evidencias aun son insuficientes, ya que existen razones fundamentadas para considerar la acción de otros factores que intensifican o producen las manifestaciones clínicas observadas [Ximénez *et al.*, 2010].

I.1.1 Epidemiología

La epidemiología de la amibiasis, previo al reconocimiento de *E. histolytica* y *E. dispar*, resulta poco precisa, ya que la mayoría de los datos provienen de estudios donde no se realizó una distinción bioquímica o molecular de las dos especies. Considerando lo anterior, las estadísticas indican que aproximadamente el 10% de la población mundial está infectada con alguna de las dos especies de *Entamoeba*. Recientemente se reportó que *E. dispar* es 10 veces más prevalente que *E. histolytica* [Visser *et al.*, 2006], lo que permite suponer que solo el 1% de esa población es portadora de *E. histolytica*.

Lo que sí es un hecho, la amibiasis es responsable de alrededor de 100 000 muertes anuales, siendo la segunda causa de mortalidad mundial por enfermedades causadas por parásitos protozoarios, superado solo por la malaria [WHO, 1997]. En México, la amibiasis se ubica entre las primeras causas de morbilidad, ocupando el quinto o sexto sitio anualmente [<http://dgepi.salud.gob.mx>]. De acuerdo a un reporte anual de la Secretaría de Salud de México, la población mexicana está altamente expuesta a *E. histolytica/E. dispar*, observándose que aproximadamente 1 de cada 12 individuos (8.4%) ha desarrollado anticuerpos anti-amibianos [Ximénez *et al.*, 2009].

La infección por *E. histolytica/E. dispar* se re ha reportado en todo el mundo; sin embargo, las regiones tropicales o sub-tropicales son áreas endémicas [Choi, *et al.*, 2005,] siendo un importante problema de salud en países de esas regiones con altos índices de pobreza y condiciones precarias de sanidad, tales como México, India, Sudáfrica, algunos países de Centro y Sudamérica y ciertos países del Pacífico Asiático [Ximénez *et al.*, 2009].

I.1.2 Ciclo de vida

El humano se infecta con *E. histolytica* mediante la ingestión de un quiste maduro tetra-nucleado, el cual viaja por el tubo digestivo hasta llegar a la tercera porción del intestino delgado, el ileon terminal, donde previo al contacto con los jugos gástricos, empieza el proceso de desenquistamiento, las paredes se reblandecen y los núcleos se duplican, dando lugar a una forma celular octa-nucleada, la que finalmente se divide en 8 trofozoitos [<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>].

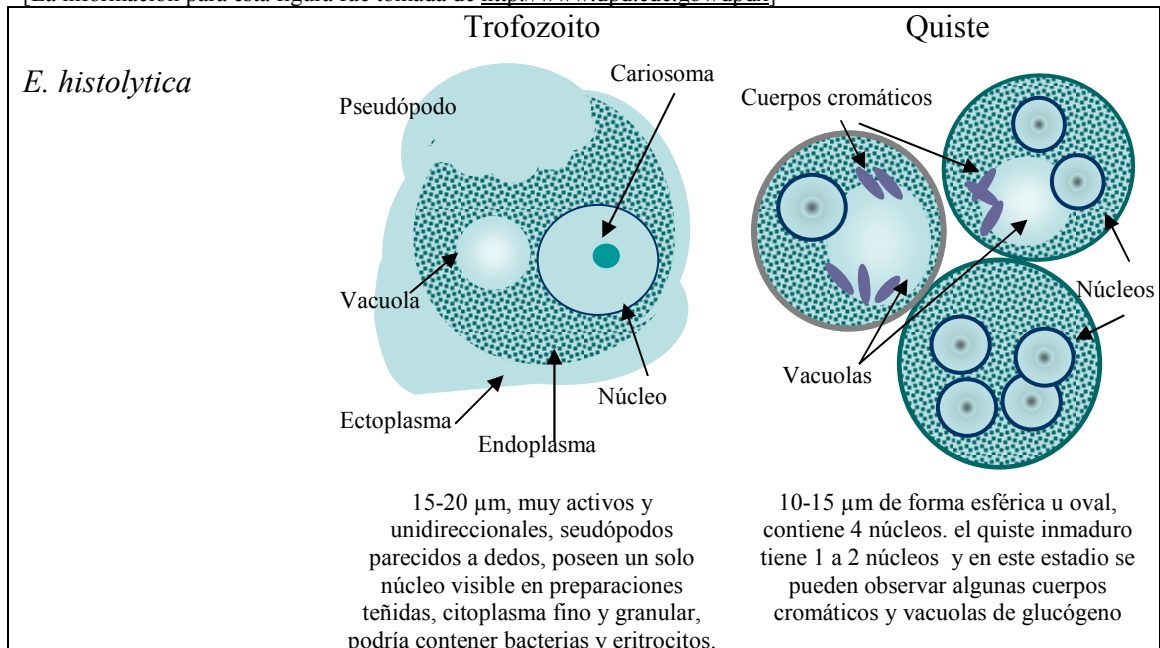
El trofozoito es la forma móvil del parásito, el cual se desplaza mediante proyecciones citoplasmáticas, llamadas pseudópodos, que le permiten fagocitar pequeñas partículas, bacterias y eritrocitos para alimentarse.

Una vez en el intestino grueso el trofozoito se multiplica por fisión binaria en la luz intestinal. El trofozoito de *E. histolytica* tiene la capacidad de invadir el colon (infección intestinal) y otros tejidos (infección extra-intestinal), mientras que ese estadio de *E. dispar* se mantiene como comensal en el colon del hospedero. La Figura 1 esquematiza algunas de las características celulares de los estadios de trofozoito y quiste de *E. histolytica*.

Cuando las condiciones del medio no son ideales para subsistir, el trofozoito se desarrolla a prequiste (mono-nucleado) y, eventualmente, madura a quiste (tetra-nucleado). Los quistes maduros son expulsados con las heces fecales; esporádicamente, algunos trofozoitos pueden ser expulsados también, pero son rápidamente destruidos en el medio ambiente, y en el remoto caso de ser ingeridos, no sobrevivirían a la acción de los jugos gástricos. Gracias a una cubierta de quitina, el quiste maduro tiene la capacidad de sobrevivir fuera del hospedero por días e incluso meses, sobre todo bajo condiciones húmedas; aunque es rápidamente destruido a temperaturas menores de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mayores de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 1. Representación grafica de los diferentes estadios de *E. histolytica*.

[La información para esta figura fue tomada de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>]



<http://entamoebahistolytica.org/>].

I.1.3 Patología

Las manifestaciones clínicas de la amibiasis varían desde la colonización intestinal asintomática hasta el síndrome disentérico. Una de las más comunes, la colitis amibiana, puede presentarse con dolor abdominal y diarrea (6 a 10 evacuaciones por día), que puede tener moco con o sin sangre. A diferencia de la disentería bacteriana, la fiebre no es un síntoma frecuente, observándose en menos del 40% de los casos. Por lo general, los síntomas desaparecen cuando se administra la terapia farmacológica anti-amibiana adecuada; sin embargo, en algunos casos pueden ocurrir complicaciones como la colitis fulminante y las fistulas, el megacolon tóxico, el absceso hepático amibiano, o la amibiasis cutánea [Adams y MacLeod, 1977; Fotedar (A) *et al.*, 2007; Ximénez *et al.*, 2009].

En México, las estadísticas indican que la amibiasis intestinal invasiva es más común entre la población infantil pre-escolar, la cual se presenta como periodos cortos de diarrea con moco y/o sangre alternado con periodos de constipación e incomodidad abdominal inespecífica; por otro lado, el absceso hepático amibiano es la manifestación extra-intestinal más común en adultos y adultos jóvenes (entre 20 y 40 años) [Ximénez *et al.*, 2009].

Los síntomas más comunes que acompañan al absceso hepático amibiano son náusea, fiebre superior a 38 °C, escalofrío, anorexia, diaforesis y dolor abdominal en el cuadrante superior derecho (que puede incrementarse con los movimientos respiratorios y puede difuminarse a los hombros y espalda). La difuminación del absceso hepático al pericardio, es tal vez la complicación más peligrosa, teniendo la capacidad de alcanzar a la cavidad peritoneal y extenderse al árbol bronquial; cuando esto sucede, los pacientes pueden expulsar material purulento con la tos. El absceso cerebral puede ocurrir, pero es poco común [Adams y MacLeod, 1977; Ximénez *et al.*, 2009].

I.1.4 Factores de virulencia

Al inicio de la invasión, el trofozoito de *E. histolytica* se enfrenta a una serie de barreras biológicas, como la mucosa intestinal, la barrera epitelial, los fagocitos y los

componentes del sistema del complemento [Guo *et al.*, 2007]. La patología resulta de tanto de las interacciones parásito-hospedero, como reflejo de la acción de los mecanismos por expulsar al parásito, como de las estrategias que desarrolla la amiba para evadir esos mecanismos [Fotedar (A) *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007].

Algunos factores que le permiten a *E. histolytica* sobrevivir e invadir el tejido humano, han sido caracterizados extensamente los últimos veinte años, tales como la lectina de superficie de unión a residuos de galactosa y N-acetil-galactosamina (Gal/NAcGal), las proteínas formadoras de poros (amibaporos) y la familia de cisteína proteinasas; sin embargo, recientemente se ha descrito una peroxirredoxina de superficie (*Ehp29*) con potencial como factor de virulencia [Davis *et al.*, 2006].

Lectina Gal/NAcGal.

La lectina Gal/NAcGal es una glucoproteína heterodimérica, de aproximadamente 260 KDa, que consta de una subunidad pesada de 170 KDa (*hgl*) y una subunidad ligera de 31-35 KDa (*lgl*), unidas mediante enlaces disulfuro; además, existe una tercera subunidad intermedia (*igl*) de 150 KDa que está asociada de una manera no covalente al complejo *hgl-lgl* [Petri *et al.*, 1987; Petri *et al.*, 1989]. Esta lectina es considerada el factor de virulencia más importante para *E. histolytica*, ya que juega un papel primordial en la cito-adhesión, al interaccionar con los residuos Gal y NAcGal de las glucoproteínas de membrana de las células epiteliales del hospedero [Espinosa-Cantellano *et al.*, 2000].

Como la citólisis depende del contacto célula-célula (amiba-hospedero), el cual ocasiona un aumento del calcio intracelular e induce la apoptosis, se ha descrito otro papel funcional de la esta lectina: gracias a su parecido estructural con CD59, se une al componente C9 del complemento (por reactividad antigénica cruzada), inhibiendo la formación del complejo de ataque a membrana mediado por el sistema del complemento [Gaucher y Chadee, 2003]. Se ha observado que los homólogos de las lectinas de *E. histolytica* y *E. dispar* difieren en estructura y función y, además, la lectina de *E. dispar* exhibe una menor capacidad de cito-adherencia y de citotoxicidad mediada por contacto [Pillai *et al.*, 1997].

Proteínas formadoras de poros (amibaporo).

Una vez que se establece el contacto con la célula diana, sucede la citolisis, proceso en el cual las proteínas formadoras de poros juegan un papel importante: permeabilizan la membrana plasmática de la célula diana, al insertarse en ella (mediante la unión a fosfolípidos aniónicos y oligomerización) para formar canales acuosos, permitiendo el tráfico libre de iones (tales como Ca^{++} , Na^+ y K^+), favoreciendo un choque osmótico y, por consecuencia, la lisis celular [Hecht *et al.*, 2004]. Los amibaporos se encuentran almacenados en vesículas citoplasmáticas que son liberadas al contacto con la célula diana, aunque su principal función es destruir las bacterias ingeridas dentro de las vacuolas digestivas [Winkelmann *et al.*, 2006].

E. histolytica contiene tres isoformas de amibaporo: A, B y C, las cuales exhiben una similitud polipeptídica de 35 – 57% y se expresan en una proporción 35:10:1 [Espinosa-Cantellano *et al.*, 2000]. Estructuralmente, presentan un motivo altamente conservado de seis residuos de cisteína, que forman tres enlaces disulfuro. Por otro lado, *E. dispar* contiene una proteína homóloga a amibaporo A, con una identidad polipeptídica el 95% y una alta similitud en la estructura secundaria propuesta; sin embargo, su actividad es 60% menor, lo cual sugiere que su presencia en *E. dispar* obedece a fines principalmente nutricionales [Nickel *et al.*, 1999].

Cisteína proteasas.

Otro grupo importante de factores de virulencia son las cisteína proteasas (*EhCP*). Estas enzimas proteolíticas son capaces de degradar los tejidos invadidos, principalmente fibronectina, colágeno, laminina y algunos otros componentes de la matriz extracelular, despojando al hospedero de la malla proteica que mantiene unidas a las células, dejándolas más susceptibles a la invasión [Bruchhaus *et al.*, 1996]. Las cisteína proteasas son las enzimas proteolíticas más abundantes de *E. histolytica*; además de estar involucradas en procesos elementales, como la nutrición y el ciclo de vida, se ha determinado que participan en el reclutamiento de células inflamatorias y activación del complemento, y tienen la capacidad de degradar a las anafilotoxinas C3a y C5a, y las inmunoglobulinas IgG e IgA [Kelsall y Ravdin, 1993; Reed *et al.*, 1995].

Se han identificado alrededor de 50 genes que codifican para este tipo de enzimas; sin embargo, la actividad proteolítica de los productos génicos de *EhCP1*, *EhCP2*, y *EhCP5* representa aproximadamente el 90% de la actividad total [Bruchhaus *et al.*, 1996]. En promedio, tienen un peso molecular cercano a 30 KDa y están presentes en las vacuolas digestivas, aun que *EhCP5* se expresa también en la superficie del trofozoito. En algunos estudios se ha observado que la presencia de *E. coli* potencia la capacidad virulenta de *E. histolytica* [Singh *et al.*, 2004] y que la alta expresión de *EhCP5* aumenta esta capacidad; interesantemente, *E. dispar* carece de los homólogos a *EhCP1* y *EhCP5*, lo que pudiera explicar parcialmente su naturaleza no invasiva [Bruchhaus *et al.*, 1996].

I.1.5 Peroxirredoxina (*Ehp29*) amebiana

La Peroxirredoxina es una enzima de 29 KDa rica en residuos de cisteína que forma parte del grupo de las peroxirredoxinas 2-cys, ya que tienen dos sitios activos cisteína Cys47 y Cys170, pertenece a la familia de las anti-oxidantes, actividad que ha sido demostrada tanto su forma nativa como en la recombinante [Torian *et al.*, 1990; Choi *et al.*, 2005]. El gen que codifica la proteína fue clonado y caracterizado a finales de los años ochenta, posteriormente se demostró que este gen codificaba un antígeno de expresión en cepas clínicas que jugaba un papel clave en la protección de la ameba durante el estrés oxidativo [Torian *et al.*, 1990; Bruchhaus *et al.*, 1997; Pool *et al.*, 1997], mas tarde se encontró que *E. dispar* expresaba una proteína homóloga que difería solo el 4.5% (a nivel de nucleótidos) [Tachibana y Cheng, 2000; Cheng *et al.*, 2004], siendo la diferencia mas significativa, que la Peroxirredoxina de *E. dispar*, contenía 10 aminoácidos extra en la región N-terminal en comparación con la de *E. histolytica* [Tachibana y Cheng, 2000].

Existe una diferencia cuantitativa que apoya la hipótesis que postula a esta proteína determinante de la virulencia: la expresión del homólogo en *E. dispar* es 50 veces menor [Choi *et al.*, 2005]; además, su expresión en la superficie del parásito favorece su papel anti-oxidante [Torian *et al.*, 1990], considerando que el homólogo de *E. dispar* se localiza primordialmente en el interior de la célula [Choi *et al.*, 2005]. Como era de esperarse, y dada la homología ya demostrada entre ambas proteínas, los anticuerpos monoclonales dirigidos

contra la Peroxirredoxina de *E. histolytica* presentan reacción cruzada con la proteína de *E. dispar* [Choi *et al.*, 2005].

Algunos estudios han propuesto que *Ehp29* se encuentra asociada a la membrana del trofozoito mediante la unión a un dominio citoplasmático de la lectina Gal/NAcGal, para estar disponible en el sitio de contacto célula-célula [Hughes *et al.*, 2003]. Entonces, es posible suponer que la Peroxirredoxina de *E. dispar* no se asocia a la lectina debido a las diferencias en su secuencia N-terminal [Choi *et al.*, 2005] y, por ende, no se retenga en la superficie del trofozoito.

I.1.6 Peroxirredoxina (*Ehp29*) como factor de virulencia

Durante el proceso de invasión, el trofozoito se ve expuesto a las altas concentraciones de radicales libres de oxígeno que los fagocitos del hospedero generan para su protección; la ameba, por su parte, cuenta con tres enzimas que le sirven como agentes anti-oxidantes: una superóxido dismutasa y una flavín reductasa, que catalizan la conversión del ión superóxido a peróxido de hidrógeno, y la peroxirredoxina (*Ehp29*), que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno. *E. histolytica* carece de actividad catalasa detectable; por lo tanto, la peroxirredoxina es clave para eliminar los productos reactivos del oxígeno [Bruchhaus *et al.*, 1997]. Además, como *Ehp29* es secretada durante la amebiasis invasiva, la mayoría de los pacientes desarrollan anticuerpos específicos contra esta proteína [Choi *et al.*, 2005].

I.2 Métodos de diagnóstico de amebiasis

I.2.1 Microscopía

La técnica rutinaria para el diagnóstico de amebiasis es la detección del parásito en muestras de heces fecales por microscopía. Este procedimiento es sensible, rápido y económico, pero poco reproducible, ya que depende directamente de la experiencia del personal de laboratorio para distinguir *E. histolytica* de otros microorganismos; además, es inespecífica, ya que no permite discriminar entre especies morfológicamente similares a *E. histolytica*, como *E. dispar* y *E. moskowskii*. En un estudio copro-parasitológico de rutina es

casi imposible observar trofozoitos, ya que su fragilidad le impide subsistir mucho tiempo después de haber sido expulsado; por lo que es más factible encontrar quistes [González-Ruiz *et al.*, 1994].

I.2.2 Cultivos de amibas

Existen técnicas de cultivo para el aislamiento de las especies de *Entamoeba*. Estos medios incluyen sistemas xénicos, monoaxénicos y axénicos. Existen varios medios reportados en la literatura, pero los más utilizados para el crecimiento de *E. histolytica* son los establecidos por Diamond (TYSGM-9 y TYI-S-33) [Clark y Diamond, 2002] y el medio de Robinson [Robinson GL, 1968]. Las muestras de heces fecales o aspirados de abscesos hepáticos son por excelencia las fuentes más comunes para el aislamiento y cultivo de *E. histolytica* [Haque *et al.*, 1998]. Considerando la naturaleza estéril del aspirado de un absceso hepático, el cultivo xénico requiere la adición de una bacteria o microorganismo al medio, previo a la siembra. Por otro lado, se ha logrado crecer *E. dispar* en cultivos xénicos y monoxénicos; sin embargo, su aislamiento en cultivos axénicos ha resultado difícil, ya que las células obtenidas son poco viables, por lo que se cree que *E. dispar* no tiene la capacidad suficiente para tomar los nutrientes directamente del medio [Fotedar (A) *et al.*, 2007].

El cultivo del parásito no es un procedimiento de rutina en laboratorios de diagnóstico clínico, está prácticamente confinado a laboratorios de investigación, ya que es una técnica difícil de estandarizar y de alto costo monetario; además, es lenta, ya que el parásito requiere varios días para el crecimiento, y difícil mantener el cultivo estéril, ya que es muy común la contaminación con bacterias, hongos u otros protozoarios [Haque *et al.*, 1998].

I.2.3 Análisis de isoenzimas

A partir de los análisis zimodemas (perfil isoenzimático: patrón de movilidad electroforética), se han descrito 24 conjuntos de aislados amibianos: 21 a partir de muestras de pacientes (8 de *E. histolytica* y 12 de *E. dispar*) y 3 obtenidos de cultivos de laboratorio [Reed *et al.*, 1991]; sin embargo, algunos de ellos no son reproducibles después de que se depuran las bacterias del medio, lo que sugiere que algunos perfiles son inespecíficos

[Fotedar (A) *et al.*, 2007]. Afortunadamente, es posible diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar* en base a los zimodemas de 4 isoenzimas: hexocinasa, glucosa fosfato isomerasa, enzima málica y fosfoglucomutasa [Blanc, *et al.*, 1991]. A pesar de que el análisis de zimodemas es aplicable a cualquier muestra clínica, es poco costeable implementarla de manera rutinaria en laboratorios de análisis clínicos debido a que presenta el inconveniente de requerir un alto número de células, lo que implica un cultivo de varios días; además, es un procedimiento que demanda personal experimentado, por lo que ha sido adoptada como una herramienta muy útil en laboratorios de investigación y estudios epidemiológicos [Haque *et al.*, 1998].

I.2.4 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) es una técnica muy sensible y específica, por lo que es un método de elección para estudios epidemiológicos y clínicos en países desarrollados y sub-desarrollados. En el caso de *E. histolytica*, las pruebas de ADN, basadas en *PCR*, son tan sensibles que pueden detectar el material genético de 5 quistes [Sanuki *et al.*, 1997] o hasta de 1 trofozoito, en una muestra de heces fecales [Mirelman *et al.*, 1997; Katzwinkel-Wladarsch *et al.*, 1994]. Además, esta técnica permite analizar muestras de aspirados de abscesos hepáticos y tejidos, lo que agiliza el procesos de detección, evitando el cultivo; aun más, los avances tecnológicos han permitido el desarrollo de estuches comerciales que facilitan la extracción de ADN de las amibas directamente de la muestra biológica, incluso a partir de muestras fijadas con formol [Furrows *et al.*, 2004].

Existe una variedad de genes polimórficos que pueden amplificarse para detectar la presencia de las especies de *Entamoeba*. Uno de los más utilizados es el gen que codifica para la molécula 18S del ARN ribosomal, el cual se encuentra en múltiples copias en unidades episomales [Fotedar (B) *et al.*, 2007]. Otros genes amplificados a partir de muestras clínicas, tal como el gen que codifican para las proteínas SREPH (proteína de superficie rica en serina) y HLY6 (hemolisina), han sido exitosamente aplicados en la detección de especies de amiba [Fotedar (A) *et al.*, 2007]. Un estudio comparativo entre un estuche comercial de ELISA y un protocolo de *PCR*, ambos diseñados para detectar específicamente *E. histolytica*, reveló que la reacción de *PCR* es 100 veces más sensible [Haque *et al.*, 1998].

A pesar de las bondades tecnológicas que ofrece la reacción de *PCR*, existe otro tipo de factores que pueden ser considerados como desventajas: el equipo y los reactivos son de valor económico inaccesible para laboratorios de diagnóstico clínico rutinario en países en vías de desarrollo, donde la amibiasis es un problema de salud pública; además, las muestras de heces fecales pueden contener inhibidores de la ADN polimerasa, lo que pudiera dar como resultado falsos negativos [Furrows *et al.*, 2004].

I.2.5 Pruebas de detección de anticuerpos

En casos de pacientes con absceso hepático, las pruebas de detección de anticuerpos séricos son otra opción para el diagnóstico de amibiasis [Abd-Alla *et al.*, 1998], ya que la confirmación de esta patología solo es posible cuando se determina la presencia de *E. histolytica* en aspirados hepáticos; sin embargo, sólo en un pequeño porcentaje de casos se puede detectar la presencia de trofozoitos [Zeehaida *et al.*, 2008]. Además, la mayoría de los pacientes con absceso hepático amibiano no presentan infección intestinal, por lo que la determinación del parásito en heces fecales (mediante microscopía o detección de antígenos) es poco útil para el diagnóstico [Zengzhu *et al.*, 1999].

Interesantemente, la mayoría de los pacientes infectados con *E. histolytica* presentan anticuerpos contra proteínas del parásito, lo que representa una ventaja para los métodos de detección de inmunoglobulinas [Abd-Alla *et al.*, 1998]. Actualmente, existen estuches comerciales para la detección de anticuerpos anti-*E. histolytica*, basados en diferentes técnicas inmunoquímicas (Tabla 1): hemaglutinación indirecta (IHA), aglutinación con perlas de látex (APL), contra-inmunolectroforesis (CIE), difusión en gel (DG), inmunodifusión (ID), fijación del complemento (FC), inmunofluorescencia indirecta (IFA), y ELISA.

La IFA es un método rápido y reproducible, con una sensibilidad del 93.6% y especificidad del 96.7%, se considera ampliamente útil, ya que permite determinar si el absceso hepático es amibiano, o de otra etiología; además de diferenciar entre una infección pasada (tratada) o un reciente [García *et al.*, 1992]. Desafortunadamente, este método requiere del cultivo de las amibas, por lo que resulta poco práctico como procedimiento de rutina. Por otro lado, las técnicas FC y CIE son ensayos que se realizan muy poco en la actualidad, ya que no se encuentran de manera comercial, tienen un costo económico elevado y presentan menor sensibilidad, comparado con otros ensayos [Fotedar (B) *et al.*, 2007].

La IHA es un método sencillo y muy específico, que ha demostrado una aplicación ideal para el diagnóstico de pacientes con absceso hepático amibiano. En cuanto a la técnica APL, tiene la ventaja de ser una prueba rápida (aproximadamente 10 minutos), es altamente específica y sensible (99.5 % en absceso hepático y 100% en colitis amibiana); sin embargo, se han reportado con relativa frecuencia la obtención de resultados falsos negativos (debido a reacciones no específicas), lo cual reduce la especificidad de esta prueba a niveles no aceptables [Sánchez-Guillen *et al.*, 2000; Van Doorn *et al.*, 2005].

Las pruebas de detección de anticuerpos de mayor utilidad, tanto para estudios epidemiológicos como para diagnóstico, son los ensayos tipo ELISA. Por este método, la detección de anticuerpos en suero de pacientes con absceso hepático amibiano es una

Tabla 1. Pruebas serológicas comerciales disponibles para el diagnóstico de amibiasis.

[Tomado de Fotedar (A) *et al.*, 2007].

Ensayo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Fabricante
Cellognost-Amoebiasis (IHA)	100, 99	90.5-100, 99.8	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany
Novagnost <i>Entamoeba</i> IgG	>95	>95	NovaTee Immundiagnostica GbH, Dietzenbach, Germany
Bichro-Latex Amibe	93.3, 98.3	95.5, 96.1	Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret Cedex, France
I.H.A. Amoebiasis	93.4	97.5	Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret Cedex, France
Amoeba-Spot IF	No disponible	No disponible	bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France
Amebiasis serology microplate ELISA	95	97	Light Diagnostics
Amebiasis Serology microwell EIA (HK-9 antigen, axenic)	97.9, 92.5	94.8, 91.3	LMD Laboratories, Inc., Carlsbad, CA
RIDASCREEN <i>Entamoeba</i> (IgG detection)	100, 97.7-100	95.6, 97.4	R-Biopharma AG, Darmstadt, Germany

herramienta muy valiosa, ya que su sensibilidad es cercana al 100%. A pesar de ser una prueba lenta, comparada con las mencionadas anteriormente, por su alta sensibilidad, especificidad y confiabilidad (no se reportan reacciones cruzadas con otros parásitos), se ha colocado como una técnica de uso rutinario en los laboratorios clínicos. Además, como ofrece resultados cuantitativos, también es de utilidad para dar seguimiento al tratamiento farmacológico de pacientes [Van Doorn *et al.*, 2005].

Las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *E. histolytica* tienen uso limitado a regiones geográficas donde la amibiasis no es endémica (países desarrollados e industrializados). Por otro lado, en las regiones geográficas donde la amibiasis es prevalente, un porcentaje elevado de la población desarrolla anticuerpos anti-amibianos; sin embargo, en estas regiones se dificulta el diagnóstico cuando se utilizan métodos serológicos, ya que estos no permiten discriminar entre una infección reciente o pasada [Abd-Alla *et al.*, 1998; Visser *et al.*, 2006].

I.2.6 Pruebas de detección de antígeno

Las pruebas de inmunodetección de antígenos amibianos están basadas en ensayos tipo ELISA, los cuales tienen una sensibilidad semejante al cultivo, pero son más rápidos y prácticos [Haque *et al.*, 1998]. Algunos estuches comerciales utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas específicas de *E. histolytica*, tal como *E. HISTOLYTICA II* (TechLab, Virginia, EUA), que detecta a la lectina Gal/NAcGal; *ENTAMOEBA CELISA PATH* (CeLLabs, Brookvale, Australia), reconoce una adhesina de *E. histolytica*; y *Optimum S ENTAMOEBA HISTOLYTICA ANTIGEN* (Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Alemania), que detecta al antígeno de superficie rico en serina.

Existen otros estuches que detectan simultáneamente a *E. histolytica/E. dispar*; *p.e. ProsPect T ENTAMOEBA HISTOLYTICA MICROPLATE EIA*, el cual utiliza un anticuerpo monoclonal que detecta el antígeno específico EHSA (Thermo Fisher Scientific, Kansas, EUA). Otros estuches reconocen a especies de *Entamoeba* como parte de un panel de diagnóstico, tal es el caso del *TRIAGE MICRO PARASITE PANEL* (Alere, Massachusetts EUA), capaz de detectar 4 parásitos utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas específicas: alfa-1-giardina de *Giardia lamblia*, la peroxirredoxina (*Ehp29*) de *E.*

histolytica/E. dispar, y la proteína disulfuro isomerasa de *Cryptosporidium parvum*. El panel *Triage* es una tira reactiva de captura de antígeno de uso fácil y rápido, se puede utilizar en campo; sin embargo, tiene una sensibilidad mayor a 1,000 células por mL; mientras que el ensayo tipo ELISA *ProSpect T* requiere ciertas condiciones y material de laboratorio para realizarse adecuadamente, pero es más sensible (reconoce el antígeno presente en una muestra de hasta 250 trofozoitos por mL) [Pillai y Kain, 1999].

Una de las ventajas de las pruebas de detección de antígeno es la posibilidad de identificar a los parásitos directamente de muestras de heces fecales frescas o congeladas, las cuales no requieren un tratamiento previo, solo solución salina para diluir [Ong *et al.*, 1996]. Tanto por su comodidad técnica y económica, como por su sensibilidad y especificidad, estos métodos se consideran en la actualidad como la herramienta de elección para el diagnóstico laboratorio de la amibiasis, en países en vías de desarrollo; sin embargo, tienen como limitante que solo se pueden utilizar muestras frescas o congeladas, ya que en las muestras fijadas se desnaturalizan los antígenos, lo que puede afectar la especificidad y sensibilidad del método [Furrows *et al.*, 2004; Ong *et al.*, 1996; Pillai y Kain, 1999]

II. JUSTIFICACION

La amibiasis en México sigue siendo un problema de salud pública, ya que la infección por *E. histolytica* sigue figurando entre las primeras diez causas de morbilidad [Ximénez *et al.*, 2009]. De acuerdo a diversos estudios, la población en ciertas regiones del país presenta una elevada prevalencia de anticuerpos anti-amibianos como consecuencia de su frecuente exposición a este protozooario. Una estrategia que permitirá conocer el impacto verdadero de la amibiasis en México será realizar un diagnóstico certero de la infección que permita al personal médico tomar las decisiones más apropiadas para el tratamiento y profilaxis de los pacientes afectados. En nuestro país, el método de laboratorio más frecuentemente empleado para realizar el diagnóstico de la amibiasis es el análisis microscópico de muestras de heces fecales (Análisis coproparasitoscópico).

El relativo bajo costo del análisis microscópico ha sido considerado la ventaja principal de esta prueba, sin embargo, su baja especificidad y sensibilidad no permiten emitir un diagnóstico inequívoco. Lograr entonces un diagnóstico definitivo, requiere de pruebas de laboratorio más sensibles, específicas y costosas. En nuestro país, las pruebas de laboratorio que permitirían el diagnóstico definitivo de la amibiasis, no se practican de manera rutinaria precisamente por su costo. Por ejemplo, las pruebas serológicas presentan un alto grado de especificidad y sensibilidad, sin embargo su valor como herramienta diagnóstica en las zonas endémicas de amibiasis es realmente limitada. La recuperación de trofozoitos de muestras clínicas seguido del análisis de isoenzimas es una prueba de muy alta especificidad pero de poca utilidad práctica para el diagnóstico clínico de rutina, por su complejidad técnica y el tiempo que requiere para realizarse.

Las pruebas basadas en la PCR, son las más específicas y sensibles; pero requieren de reactivos y equipos un tanto especializados lo cual limita su uso como pruebas de rutina en el laboratorio clínico. Las pruebas basadas en la detección de antígeno (captura de antígeno) pueden llegar a ser altamente sensibles y específicas (algunas incluso detectan *E. histolytica* de manera específica). Se pueden llevar a cabo de manera rutinaria en el laboratorio clínico. Y aunque su costo unitario no es bajo (muchos de los estuches comerciales de detección de Ag disponibles en el mercado tienen un costo alto por prueba), presentan características

ideales para realizar el diagnóstico de amibiasis de manera rápida y si su costo pudiera ser reducido podrían convertirse en los métodos de elección.

En México, la decisión para iniciar el tratamiento farmacológico de la amibiasis se basa muchas veces exclusivamente en el cuadro clínico, o en pruebas diagnósticas inespecíficas. El diagnóstico incompleto de amibiasis en nuestro país ha llevado a que no se tengan datos estadísticos reales sobre la prevalencia de las infecciones por *E. histolytica*/*E. dispar* y a que muchos de los pacientes no reciban el tratamiento adecuado, porque no se determina con certeza la causa subyacente del cuadro clínico.

Para detectar al parásito, dar al paciente un seguimiento post-infección u obtener datos de prevalencia es necesario desarrollar pruebas de laboratorio que sean reproducibles, sensibles y que estén al alcance económico y tecnológico de cualquier laboratorio.

A fin de contribuir a la solución de la problemática anterior, este proyecto pretende desarrollar un ensayo tipo *ELISA* de captura de antígeno, que detecte de manera específica a *E. histolytica*/*E. dispar*, utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra la peroxirredoxina de *Entamoeba histolytica* (*Ehp29*). Se espera, que este nuevo ensayo, sea una herramienta útil para el área diagnóstica y/o epidemiológica, y que sea la base para el desarrollo futuro de una tira reactiva de captura de antígeno.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

Desarrollo y optimización de un ensayo de *ELISA* (de captura de antígeno), para la detección específica de Peroxirredoxina de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*.

III.2 Objetivos específicos

1. Expresión y purificación de la Peroxirredoxina recombinante de *Entamoeba histolytica* a partir de la clonas de *Escherichia coli* XL1-Blue MFR' transformadas con pQE30EhPerox.
2. Obtención de anticuerpos policlonales monoespecíficos dirigidos contra Peroxirredoxina de *Entamoeba histolytica*.
3. Caracterización de los anticuerpos monoespecíficos anti-Ehp29
4. Diseño, desarrollo y optimización de un ensayo tipo ELISA de captura de antígeno utilizando los anticuerpos policlonales anti-Ehp29.

IV. MATERIALES Y METODOS

IV.1 Reactivos químicos y biológicos

IV.1.1 Plásmidos

El plásmido de expresión de la peroxirredoxina amibiana recombinante fue obtenido a partir de la reserva de vectores del Laboratorio de Biotecnología, FCQI-UABC. Brevemente, la secuencia nucleotídica codificante para el péptido comprendido entre los residuos K⁵² a H²⁷³ (NCBI™ AAA29110) fue amplificada mediante PCR, utilizando dos oligonucleótidos específicos como iniciadores (Tabla 2) y el plásmido pBAD/ThioEh29kDa como molde [Reed *et al.*, 1992]. Este plásmido fue donado amablemente por la Dra. Sharon

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *Ehp29*.

Nombre	Secuencia (5' a 3')
EhPerox29kDaTerCod 4 F	gcg <u><i>gga tcc</i></u> AAA GAA TGT CAA GAG AAA GAA TGT TGT AA <i>Bam</i> HI
EhPerox29kDaTerCod 4 R	gcg <u><i>aag ctt</i></u> TTA ATG TGC TGT TAA ATA TTT CTT AAT TCC <i>Hind</i> III

La secuencia adaptadora para los sitios de restricción se indica en itálica y subrayada.

L. Reed (Escuela de Medicina, UCSD). El producto de amplificación fue analizado, purificado y subclonado en el sitio *Sma* I del plásmido pBluescript SK- (*Stratagene*). Posteriormente, el gen *Ehp29* fue re-amplificado utilizando dos oligonucleótidos universales (KS y SK). El producto fue digerido con las endonucleasas *Bam* HI y *Hind* III; y subclonado en el plásmido de expresión pQE30 (*Qiagen*). El plásmido recombinante, pQE30EhPerox, fue analizado mediante un estricto análisis de restricción.

IV.1.2 Células y medios

Las cepas *E. histolytica* HM-1: IMSS y *E. dispar* SAW 1734 fueron cultivadas en medio líquido TYI-S-33 [Diamond *et al.*, 1978]. La cepa *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'

(*Stratagene*) fue cultivada en medio líquido *Luria-Bertani* (LB: 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 0.5% de NaCl).

IV.1.3 Anticuerpos

Dos anticuerpos policlonales producidos en cabra: uno anti-IgG de ratón y otro anti-IgG de conejo, acoplados a fosfatasa alcalina, y un anticuerpo monoclonal producido en ratón anti-poli-histidina fueron adquiridos de la compañía *Sigma* de México. Por otro lado, un anticuerpo monoclonal producido en ratón anti-*Ehp29* FP10 fue facilitado por la Dra. Sharon S. Reed [Choi *et al.*, 2005].

IV.1.4 Reactivos químicos

La resina *Sepharose®-4B-Protein A*, el conjugado *ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase* y los reactivos *Tween® 20*, bromuro de etidio, azul de bromo-fenol y azul de metileno fueron de la compañía *Sigma* de México. Los reactivos Tris base (tris [hidroximetil] aminometano), EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético) disódico, SDS (dodecilsulfato de sodio) y glicerol fueron de *IBI*. El azul brillante de *Coomassie R-250* y el TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina) pertenecen a la marca comercial *Bio-Rad Laboratories, Inc.* También se utilizó el β -mercaptoetanol de la marca *EM Science Inc.*, imidazol de *Fisher Biotech*, el persulfato de amonio ($[\text{NH}_4]_2\text{S}_2\text{O}_8$) de *J. T. Baker ®* y glicina de *ICN*. El marcador de peso molecular *Prestained Protein Marker Broad Range* y la albúmina sérica bovina fueron de *New England BioLabs*.

IV.2 Equipo

Las determinaciones espectrofotométricas UV (en celda de cuarzo) se realizaron en un *Smart Spec™ Plus Spectrophotometer* y las colorimétricas (en placa de microtitulación) mediante un lector *Microplate Reader 680*, ambos de *Bio-Rad Laboratories, Inc.*; además, la separación de proteínas se realizó en una cámara *mini-Protean III* de la misma compañía.

IV.3 Expresión y purificación de *Ehp29* recombinante

IV.3.1 Expresión

2 mL de un cultivo joven de *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' portadora del plásmido pQE30Eh29KDa fueron inoculados a 100 mL de medio LB-ampicilina (a una concentración final de 0.15 mg/mL). El cultivo fue incubado durante 2 h a 37 °C, con agitación (300 rpm). Posteriormente, se agregaron 10 µL de IPTG 1 M (concentración final de 0.1 mM) y se continuo la incubación durante 4 h a 37 °C, con agitación (300 rpm). Las células obtenidas se centrifugaron a 4,500 rpm durante 10 min. La pastilla celular se resuspendió en 3 mL de amortiguador de lisis de urea (urea 8 M; NaCl 300 mM; imidazol 10 mM; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0), se agitó mediante vórtex durante 5 min, y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, con agitación moderada constante (*Rocking Platform*). La fracción soluble (FS) fue separada mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min.

IV.3.2 Purificación

Una columna cromatográfica de 0.5 mL de agarosa-NTA-Níquel fue preparada mediante lavado con 20 mL de H₂O destilada y 10 mL de solución amortiguadora de lisis (Urea 8 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0). Posteriormente, la solución FS fue cargada lentamente a la columna y se recolectó el efluente (fracción no pegada, FNP). Enseguida, la columna fue lavada con 10 mL de solución amortiguadora de replegamiento (NaCl 300mM; imidazol 10 mM, pH 8.0; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0) y se recolectó el efluente (fracción de refolede, FR). Adicionalmente, la columna fue lavada con 10 mL de solución amortiguadora de lavado (NaCl 300 mM; imidazol 20 mM, pH 8.0; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0) y se recolectó (fracción de lavado, W). Finalmente, la proteína *Ehp29* fue separada mediante la adición de 5 mL de solución amortiguadora de elución (NaCl 300 mM; imidazol 250 mM, pH 8.0; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0), recolectándose 10 alícuotas (0.5 mL) en microtubos. Las fracciones eluidas fueron analizadas mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, al 12%) (Anexo 1). Los geles obtenidos se tiñeron con azul de *coomassie* y las fracciones donde se observó la proteína de interés se recolectaron. Finalmente, se determinó la concentración de peroxirredoxina recombinante mediante

Tabla 3. Características generales del ensayo para la titulación del suero hiper-inmune.

Componente	Control 1	Control 2	Problema
<i>Ehp29</i> (antígeno)	X	X	X
Dilución de Suero Problema (anticuerpo primario)	-	-	X
anti-IgG de conejo acoplado a FA (anticuerpo secundario)	X	-	X
<i>p</i> -NPP (sustrato de FA)	X	X	X

FA: Fosfatasa Alcalina

espectrofotometría UV a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado de 0.75 mg/mL.

IV.4 Obtención de anticuerpos policlonales anti-*Ehp29*

IV.4.1 Esquema de inmunización

Un conejo blanco fue inmunizado por vía subcutánea (en diferentes puntos de la superficie dorsal posterior) durante 13 meses. Antes de la primera inmunización, se realizó un primer sangrado. El suero obtenido fue considerado como pre-inmune (PI). La dosis inicial (100 µg de *Ehp29*) fue preparada mezclando una emulsificación a partir de 0.5 mL de solución de proteína (0.2 mg/mL en PBS 1X) y 0.5 mL de adyuvante completo de *Freund* (*Sigma*). Las administraciones posteriores fueron realizadas utilizando la misma cantidad de proteína, cada 8 días y usando adyuvante incompleto de *Freund* (*Sigma*). Después de 3 meses de inmunización continua, la dosis de antígeno fue aumentada al doble (200 µg de *Ehp29*).

IV.4.2 Obtención de suero hiper-inmune

Todos los sangrados se realizaron mediante punción de la vena central de la oreja. Cada 20 días se obtuvieron 2 a 4 mL de sangre total. La sangre extraída fue incubada a 37 °C durante 1–2 h; posteriormente, el suero fue separado mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 5 min. El suero fue almacenado -20 °C. El último sangrado fue realizado

mediante punción cardiaca, donde se obtuvieron 30 mL de sangre total. El título de anticuerpos fue determinado mediante análisis de *ELISA* indirecto (por triplicado). El esquema de análisis de las muestras se describe en la Tabla 3.

IV.4.3 Inmunoensayo tipo *ELISA* indirecto

Sensibilización: todos los pocillos de una placa de micro-titulación fueron sensibilizados con 500 ng de *Ehp29* (100 μ L de una solución 5 ng/ μ L; en amortiguador de bicarbonatos 0.1 M, pH 9.5) durante toda la noche temperatura ambiente.

Bloqueo: los pocillos fueron lavados 3 veces con 0.2 mL de solución amortiguadora de lavado (NaCl 150 mM; MgSO₄ 40 mM; Tween[®]20 0.1%; Tris-HCl 50 mM, pH 8). Enseguida, se añadieron 0.2 mL de solución de bloqueo (Gelatina 0.5%; Tween[®]20 0.05%; Tris-HCl 50 mM, pH 8) y se incubó la placa durante 2 h a temperatura ambiente.

Reconocimiento primario: los pocillos fueron lavados 3 veces con 0.2 mL de solución amortiguadora de lavado. Posteriormente, 100 μ L de solución de reacción fueron añadidos a cada pocillo y, en un microtubo, se preparó una dilución 1:50 del suero hiper-inmune. Enseguida, a partir de la dilución se prepararon diluciones seriadas 1:3 en los 10 primeros pocillos de cada fila. *p.e.* en el pocillo 1 (dilución 1:150) se mezclaron 50 μ L de la dilución 1:50 con los 100 μ L de solución de reacción; en el pocillo 2 (dilución 1:450), se mezclaron 50 μ L de la dilución 1:150 con los 100 μ L de solución de reacción, y así sucesivamente hasta el pocillo 10 (dilución 1:2,952,450). La placa fue incubada durante 1 h a temperatura ambiente.

Reconocimiento secundario: los pocillos fueron lavados 3 veces con 0.2 mL de solución amortiguadora de lavado. En un tubo cónico de 15 mL, se preparó una dilución 1:5,000 de anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina y se añadieron 100 μ L de ésta a los pocillos 1 a 11 de cada fila. La placa fue incubada durante 1 h a temperatura ambiente.

Revelado: los pocillos fueron lavados 3 veces con 0.2 mL de solución amortiguadora de lavado. Cada pocillo recibió 100 μ L de sustrato de fosfatasa alcalina: *p*-nitrofenil fosfato (*p*-NPP mono-sódico 40 μ M en solución amortiguadora de bicarbonatos 0.1M, pH 9.5). La reacción enzimática se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se detuvo mediante

la adición de 50 μ L de NaOH 1.5 M. El color desarrollado fue cuantificado mediante un lector espectrofotométrico de micro-placas a una longitud de onda de 415 nm (A_{415}).

IV.5. Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29*

IV.5.1 Preparación de la resina *Sepharose*[®]-4B acoplada a proteínas bacterianas

Preparación de un extracto proteico soluble de Escherichia coli. La pastilla celular de un cultivo joven de *E. coli XL1Blue MRF'* fue resuspendida en 0.5 mL de solución amortiguadora de lisis (urea 8M; NaCl 300mM; imidazol 10mM; Tris-HCl 100mM, pH 8.0), se agitada en un vórtex, y se mantuvo en agitación suave constante durante 15 min. El extracto bacteriano proteico soluble (EBPS) fue obtenido mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min. Posteriormente, el EBPS se dializó (Anexo 2) contra un amortiguador de bicarbonatos (NaHCO₃ 0.1 M, pH 9.5) durante 4 h, y la concentración proteica se determinó mediante espectrofotometría UV a 280 nm.

Preparación de la resina Sepharose-EBPS. La resina *Sepharose*[®]-4B-CNBr (*Sigma*) fue activada según el protocolo del fabricante. Brevemente, 0.5 g fueron resuspendidos en 50 mL de HCl 1mM y mantenidos a temperatura ambiente durante 30 min, para eliminar el conservador y favorecer la activación de los grupos reactivos (cianatos); posteriormente, la suspensión se filtró y lavó con 50 mL de HCl 1mM. La resina activada se transfirió a un tubo cónico que ya contenía 5 UA₂₈₀ del EBPS. La reacción de acoplamiento se dejó durante una noche con agitación constante y suave. Los grupos reactivos no acoplados fueron inactivados mediante la adición 0.6 mL de Tris-HCl 1M, pH 8.0. Mediante este procedimiento se obtuvieron aproximadamente 3 mL de resina *Sepharose-EBPS*, de los cuales 1.5 fueron utilizados en el protocolo de purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29*.

IV.5.2 Preparación de la resina *Sepharose*[®]-4B acoplada a *Ehp29*

Preparación Ehp29 recombinante. La proteína obtenida mediante el procedimiento descrito en la sección V.3 se dializó (Anexo 2) contra un amortiguador de bicarbonatos (NaHCO₃ 0.1 M, pH 9.5) durante 4 h, y la concentración proteica se determinó mediante espectrofotometría UV a 280 nm.

Preparación de la resina Sepharose-Ehp29. La resina *Sepharose*[®]-4B-CNBr (*Sigma*) fue activada según el protocolo del fabricante. La resina activada se transfirió a un tubo cónico que ya contenía 5 mg de *Ehp29*. La reacción de acoplamiento se dejó una noche con agitación constante y suave. Los grupos reactivos no acoplados fueron inactivados mediante la adición 0.6 mL de Tris-HCl 1M, pH 8.0. Mediante este procedimiento se obtuvieron aproximadamente 3 mL de resina *Sepharose-Ehp29*, de los cuales 1.5 fueron utilizados en el protocolo de purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29*.

IV.5.3 Procedimiento de purificación de anticuerpos anti-*Ehp29*

Acondicionamiento y recuperación de las resinas cromatográficas. Todas las resinas, en columnas de cromatografía, fueron lavadas con 10 mL de solución PBS 1X, seguida de 10 mL de solución de ácido acético 0.1 M, y mantenidas en solución PBS 1X, en preparación para la purificación de anticuerpos. Después de su aplicación, las resinas fueron regeneradas mediante lavados con 5 mL de PBS 1X, 20 mL de ácido acético 0.1 M, 10 mL de PBS 1X, 10 mL ácido acético 0.1 M y 10 mL de PBS 1X. Las columnas se conservaron a 4 °C.

*Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29*.* Una mezcla de 2 mL suero hiper-inmune y 8 mL de PBS 1X fue clarificada mediante centrifugación a 4,500 rpm durante 10 min. El sobrenadante recuperado se cargó a la columna de *Sepharose-EBPS* y el efluente fue recuperado (libre de anticuerpos anti-proteínas de *E. coli*) fue conservado 4 °C para su uso posterior. El efluente libre de anticuerpos anti-proteínas de *E. coli* fue pasado por una columna de *Sepharose-Protein A* (*Sigma*). Considerando que la proteína A de *S. aureus* tiene una alta afinidad por las regiones *Fc* de inmunoglobulinas IgG de mamíferos, los anticuerpos IgG unidos a la columna se eluyeron con 15 mL de ácido

acético 0.1 M, recolectándose alícuotas de 1 mL en microtubos que contenían 200 µL Tris-HCl 1M (pH 8.0), todas las fracciones se homogenizaron inmediatamente después de su recolección. La concentración de proteínas se determinó mediante espectrofotometría UV a 280 nm. Las fracciones con la mayor concentración proteica se mezclaron (IgG total) y se conservaron a 4 °C para su uso posterior. La fracción de IgG total se cargó a la columna de *Sepharose-Ehp29*. La columna fue lavada con 10 mL de PBS 1X y los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29* purificados fueron eluidos 20 mL de ácido acético 0.1 M, recolectándose en fracciones de 1 mL. La concentración de proteínas se determinó en cada fracción mediante espectrofotometría UV a 280 nm. Las fracciones con la mayor concentración de proteínas se mezclaron (IgG anti-*Ehp29*).

IV.6 Caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29*

IV.6.1 Evaluación de la especificidad contra el antígeno recombinante

Separación de proteínas mediante SDS-PAGE. 2 µg de EBPS (sección IV.5.1), 2 µg de *Ehp29* recombinante (sección IV.3), y 2 µg de albúmina sérica de bovino (*New England Biolabs*) fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, Anexo 1).

Electrotransferencia de proteínas. Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, usando el procedimiento descrito para la cámara de transferencia *CriterionTM Blotter* (*Bio-Rad*), durante 30 min a 100 volts. Enseguida, la membrana de nitrocelulosa fue colocada en solución amortiguadora de bloqueo (leche *Svelty* de *Nestle*[®] 5%; NaCl 50mM; Tween[®]20 0.05%; Tris-HCl 10 mM, pH 8.0) e incubada durante una noche con agitación suave y constante.

Inmunodetección. Previamente, la membrana fue lavada con solución TBST (NaCl 50 mM; Tween[®]20 0.05%; Tris-HCl 10 mM, pH 8.0), 3 lavados de 10 min cada uno. El procedimiento de inmunodetección se realizó siguiendo las condiciones y controles descritos en la Tabla 4. Los anticuerpos fueron utilizados a las siguientes diluciones: monoclonal anti-

Tabla 4. Condiciones de reconocimiento para la caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29* contra antígeno recombinante.

Reconocimiento	Membrana			
	1	2	3	4
Primario				
anti-poli-histidina monoclonal de ratón	X	-	-	-
anti- <i>Ehp29</i> FP10 monoclonal de ratón	-	X	-	-
anti- <i>Ehp29</i> policlonal de conejo	-	-	X	-
<i>Ehp29</i> :anti- <i>Ehp29</i> (100:1) policlonal de conejo	-	-	-	X
Secundario				
anti-IgG de ratón policlonal de cabra acoplado a FA	X	X	-	-
anti-IgG de conejo policlonal de cabra acoplado a FA	-	-	X	X

FA: Fosfatasa Alcalina

poli-histidina 1:10,000; monoclonal anti-*Ehp29* 1:500; y policlonal mono-específico anti-*Ehp29* 1:100. Para el ensayo de competencia, *Ehp29*:Anti-*Ehp29* (100:1), la mezcla fue previamente incubada a 37°C durante 1 h. En todos los casos, los anticuerpos se diluyeron en solución TBST, se añadieron y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados con TBST (como antes), los anticuerpos de reconocimiento secundario se diluyeron 1:5,000 en TBST, se añadieron y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron tres lavados con TBST (como antes) y el inmuno-reconocimiento fue revelado usando el sustrato para fosfatasa alcalina, BCIP-NBT (*Zymed*), hasta la aparición de las bandas correspondientes.

IV.6.2 Evaluación de la especificidad contra antígeno nativo

Extracción de proteínas solubles de E. histolytica y E. dispar. Se cosecharon los trofozoitos de dos matraces de T25 con crecimiento confluyente de *E. histolytica* y *E. dispar*, respectivamente. Brevemente, se decantó casi todo el medio de cultivo, dejando sólo 5-10 mL, y los matraces se colocaron sobre hielo durante 15 min para despegar a los trofozoitos de la superficie; inmediatamente después, los trofozoitos despegados fueron resuspendidos y transferidos a un tubo cónico estéril de 50 mL. Los trofozoitos fueron separados mediante centrifugación durante 5 min a 2000 rpm y 10°C, y lavados dos veces con solución DPBS 1X estéril (10 y 20 mL, respectivamente). Previo al último lavado, el número de trofozoitos es cuantificado con la ayuda de un hemocitómetro. Los trofozoitos fueron resuspendidos a una concentración final de 2000 células/ μ L en DPBS 1X estéril (suplementado con E-64 100 μ M,

Tabla 5. Condiciones de reconocimiento para la caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29* contra antígeno nativo.

	Membrana	
	1	2
1	2 000 células <i>Eh</i>	100 células <i>Eh</i>
2	5 000 células <i>Eh</i>	200 células <i>Eh</i>
3	10 000 células <i>Eh</i>	500 células <i>Eh</i>
4	10 000 células <i>Ed</i>	1 000 células <i>Eh</i>
5	20 000 células <i>Eh</i>	2 000 células <i>Eh</i>
6	20 000 células <i>Ed</i>	5 000 células <i>Eh</i>
7	40 000 células <i>Eh</i>	10 000 células <i>Eh</i>
8	40 000 células <i>Ed</i>	20 000 células <i>Eh</i>

Tritón X-100 1% y un cóctel de inhibidores de proteasas 1X [Roche]). La lisis celular fue favorecida mediante agitación mecánica en un vórtex y varios ciclos de congelación/descongelación. Finalmente, los extractos amibianos proteicos solubles se obtuvieron mediante centrifugación durante 15 min a 14,500 rpm. El sobrenadante se separó cuidadosamente y fue procesado de inmediato para realizar ensayos de ELISA y *Western Blot*. Los extractos amibianos proteicos solubles remanentes se almacenaron en un ultracongelador a -70°C.

Separación, electrotransferencia de proteínas amibianas e inmunodetección. Diferentes cantidades de los extractos amibianos proteicos solubles (equivalentes al número de trofozoitos, Tabla 5) fueron separadas mediante SDS-PAGE (Anexo 1). La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y la inmunodetección se realizó como antes (sección IV.6.1), con una adaptación en el reconocimiento primario: el anticuerpo policlonal mono-específico anti-*Ehp29* se utilizó a una dilución 1:410.

Análisis densitométrico. Después del revelado, la membrana fue digitalizada (con la asistencia de un escáner) y se realizó un análisis de la densidad digital de las bandas utilizando el programa (de libre acceso) *ImageJ*[®] 1.43u para Mac (NIH).

IV.7 Precipitación de anticuerpos anti-*Ehp29* con sulfato de amonio

Una solución de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29* (80 mL) obtenida (sección IV.5) se colocó en un baño de hielo y se le adicionó sulfato de amonio ($[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$) hasta una saturación final del 45%. Para completar la precipitación, la solución

se mantuvo durante 4 h con agitación constante en un baño de hielo, y posteriormente se dejó en reposo durante 12 h a 4°C. Los anticuerpos precipitados fueron separados mediante centrifugación a 4,000 Xg durante 20 min. La pastilla se resuspendió en 1 mL de PBS 1X. Para eliminar el sulfato de amonio remanente, la solución concentrada de anticuerpos se dializó contra PBS 1X (Anexo 2). La concentración proteica se determinó mediante espectrofotometría UV a 280 nm y el título fue determinado mediante un inmuno ensayo enzimático tipo *ELISA* (sección IV.4.3).

IV.8 Preparación del anticuerpo anti-*Ehp29* de reconocimiento directo

La biotinización de los anticuerpos anti-*Ehp29* concentrados se realizó utilizando el estuche comercial *ImmunoProbeTM Biotinylation Kit (Sigma)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 38 µL del reactivo BAC-sulfo-NHS (éster 3-sulfo-N-succinimida de biotín-amino-caproato) y 1 mL de la solución de anticuerpos. La reacción se llevó a cabo con agitación durante 30 min a temperatura ambiente. Para separar la biotina hidrolizada o remanente, se realizó una filtración en gel (usando una columna de *Sephadex G-25M*, previamente equilibrada con 30 mL de PBS 1X). Los anticuerpos biotinilados fueron recuperados usando 9 mL de PBS 1X, recolectándose fracciones de 1mL. La concentración de biotina y proteína fue determinada mediante espectrofotometría Vis-UV a 280 y 500 nm. Las fracciones que contenían una alta concentración de proteína biotinilada se mezclaron.

Para determinar el rendimiento de la reacción de biotinización, 0.1 mL de proteínas biotiniladas fue diluido 1:10 con PBS 1X y se determinó la concentración mediante espectrofotometría UV a 280 nm [Muestra de Proteína]. Después se mezclaron 0.1 mL de solución HABA (ácido 4-hidroxiazobencen-2-carboxílico 10 mM) con 3.2 mL de solución de avidina y realizó una lectura de absorbancia a 500 nm [HABA-Avidina]. Posteriormente, se mezclaron 0.9 mL de la solución HABA-Avidina con 0.1 mL de solución de proteínas biotiniladas previamente incubadas durante 1.5 h a 37°C con 10 µL de pronasa [Biotina-Muestra]. Finalmente, se mezclaron 0.9 mL de solución HABA-Avidina con 0.1 mL de PBS [HABA-Control]. Se determinó la absorbancia de las muestras HABA-Control y Biotina-Muestra a 500 nm.

Tabla 6. Eficiencia del inmunoensayo tipo *ELISA* directo con anticuerpo de captura anti-*Ehp29* contra antígeno recombinante.

Pocillo	anti- <i>Ehp29</i>	Bloqueo	<i>Ehp29</i>	Anti- <i>Ehp29</i> -Biotina	Estreptoavidina-FA
1	X	X	-	-	X
2	-	X	X	-	X
3	-	X	-	X	X
4	X	X	X	-	X
5	X	X	-	X	X
6	-	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X
8	-	X	-	-	X
9	-	X	-	-	X
10	-	X	-	-	X

Los anticuerpos biotinilados (anti-*Ehp29*-Biotina) se titularon mediante un ensayo de *ELISA* directo, donde el anticuerpo primario fue reconocido utilizando un conjugado estreptoavidina acoplada a fosfatasa alcalina (*Sigma*) a una dilución de 1:5,000.

IV.9 Inmunoensayo tipo *ELISA* directo con anticuerpo de captura anti-*Ehp29*

IV.9.1 Eficiencia contra antígeno recombinante

La eficiencia del inmunoensayo tipo *ELISA* directo con anticuerpo de captura anti-*Ehp29* contra antígeno recombinante se realizó un ensayo bajo las siguientes condiciones: varios pocillos de una placa de micro-titulación se sensibilizaron con anticuerpos anti-*Ehp29* (anticuerpo de captura) diluidos 1:410 en amortiguador de bicarbonato 0.1 M, pH 9.5 (ver Tabla 6). La placa se incubó durante una noche a temperatura ambiente. Todos los pocillos se lavaron y bloquearon como antes (sección IV.4.3). Enseguida, se añadió 100 µL de una solución 5 ng/µL de *Ehp29* recombinante, en solución amortiguadora reacción (Tris-HCl 50 µM, pH 8; Gelatina 0.2%; Tween 20 0.1%; NaCl 0.5 M). La interacción proteína-anticuerpo se dejó incubando durante 1 h a temperatura ambiente. Para el reconocimiento primario se utilizó el anticuerpo anti-*Ehp29*-Biotina, añadiéndose 100 µL por pocillo (dilución 1:836), e incubándose durante 1 hora. El complejo anticuerpo de captura – antígeno – anticuerpo primario fue detectado con 100 µL de estreptoavidina acoplada a fosfatasa alcalina (*Sigma*) a una dilución de 1:5,000, incubándose durante 1 h. Finalmente, el inmuno-reconocimiento fue revelado con 100 µL del sustrato (*p*-nitrofenil fosfato). Después de 30 min, la reacción

Tabla 7. Diluciones de *Ehp29* en el ensayo de *ELISA* directo con anticuerpo de captura.

Pocillo	<i>Ehp29</i> recombinante		
	ng	nmoles	moléculas
1	5 000	0.185	$1.11 \cdot 10^{14}$
2	1 666.6	$6.2 \cdot 10^{-2}$	$3.71 \cdot 10^{13}$
3	555.5	$2.05 \cdot 10^{-2}$	$1.23 \cdot 10^{13}$
4	185.2	$6.85 \cdot 10^{-3}$	$4.13 \cdot 10^{12}$
5	61.7	$2.28 \cdot 10^{-3}$	$1.38 \cdot 10^{12}$
6	20.5	$7.61 \cdot 10^{-4}$	$4.58 \cdot 10^{12}$
7	6.8	$2.53 \cdot 10^{-4}$	$1.53 \cdot 10^{11}$
8	2.3	$8.43 \cdot 10^{-5}$	$5.07 \cdot 10^{10}$
9	0.75	$2.81 \cdot 10^{-5}$	$1.68 \cdot 10^{10}$
10	0.25	$9.25 \cdot 10^{-5}$	$5.57 \cdot 10^9$

enzimática se paró agregando a cada pocillo 50 μ L de NaOH 1.5 M. La intensidad del color desarrollado en cada pocillo se determinó midiendo la absorbancia con un lector de microplacas a 415 nm. Los ensayos se realizaron por duplicado.

IV.9.2 Titulación de antígeno recombinante

Una placa de micro-titulación fue sensibilizada con anticuerpos anti-*Ehp29* y bloqueada como antes (sección IV.8.1). Enseguida, se agregó 100 μ L de solución amortiguadora de reacción a todos los pocillos para después añadir la *Ehp29* recombinante bajo un patrón de dilución seriado (Tabla 7). La reacción se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. El complejo anti-*Ehp29*-*Ehp29* fue reconocido utilizando anti-*Ehp29*-Biotina (diluida 1:836). La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, el complejo anticuerpo de captura – antígeno – anticuerpo primario fue detectado como antes (sección IV.8.1).

IV.9.3 Límite de detección de antígeno nativo

Un ensayo similar al descrito en la sección anterior se realizó para titular la *Ehp29* nativa. Se realizaron diluciones seriadas de los extractos proteicos de *E. histolytica*, solubles e insolubles: 100, 200, 400, 800, 1 560, 3 125, 6 250, 12 500, 25 000 y 50 000 células.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

V.1 Expresión y purificación de *Ehp29* recombinante

La expresión de la peroxirredoxina amibiana (*Ehp29*) recombinante se indujo en *E. coli* (XL1-Blue MRF[']) transfectada con el plásmido pQE30EhPerox usando como inductor a isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG, un análogo no metabolizable de la galactosa). Las células fueron lisadas en condiciones desnaturalizantes (urea 8M) y, posteriormente, la proteína *Ehp29* recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad a metales con una columna de níquel-agarosa, gracias a que la proteína se expresa con un hexámero de histidinas (el cual forma un enlace de coordinación con Ni⁺²). La Figura 2 muestra el patrón de movilidad electroforética de las fracciones cromatográficas separadas en un gel de poliacrilamida-SDS al 12%. Como se puede observar, la proteína purificada presenta un peso molecular de ~40 KDa (fracciones E1-E4). Interesantemente, ese valor es mucho mayor al esperado (26.3 KDa). Esta inconsistencia puede ser considerada como un artefacto experimental por dos razones: primero, es posible que un gran número de moléculas de SDS se hayan unido a la estructura desnaturalizada, alterando su peso molecular; y segundo, es

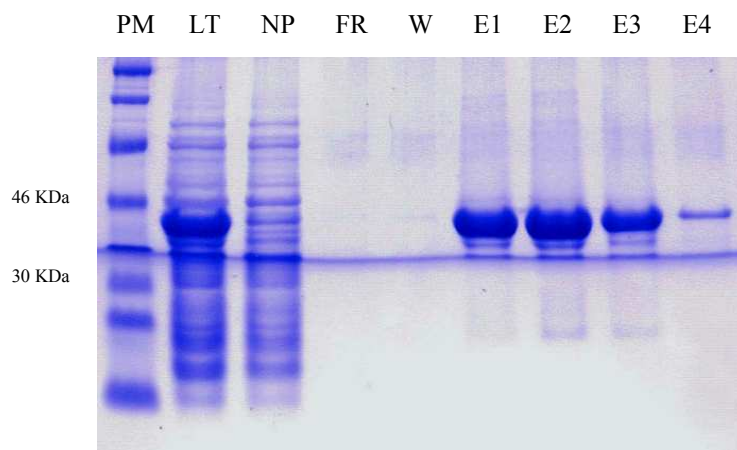


Figura 2. Separación electroforética (SDS-PAGE al 12%) de las fracciones de purificación de *Ehp29* recombinante.

PM: Marcador de peso molecular; LT: Lisado bacteriano total; NP: Fracción no pegada; FR: Fracción de renaturalización; W: Fracción de Lavado; E1-E4: Fracciones de elución.

probable que la reducción haya sido incompleta y que, en consecuencia, se formaran estructuras parcialmente reducidas. En otras palabras, existen factores no asociados directamente con el peso molecular de la proteína que pueden condicionar hacia un patrón de migración anómalo [Griffith, 1972; Rath *et al.*, 2009]. A partir de las fracciones de mayor concentración proteica, se obtuvo mezcla cuya concentración fue de 1.416 mg/mL.

V.2 Obtención y titulación de suero hiper-inmune anti-*Ehp29*

El suero hiper-inmune anti-*Ehp29* fue obtenido de un conejo que fue inmunizado durante ~13 meses con la proteína recombinante, siguiendo el protocolo descrito en la sección V.4. La respuesta inmunológica fue valorada mediante la determinación del título

de anticuerpos, el cual se analizó mediante ensayos de ELISA cada 2-4 semanas. La Figura 3A muestra las curvas dosis-respuesta de la titulación registrada en 4 muestras obtenidas durante el esquema de inmunización. Como se observa, las curvas muestran una

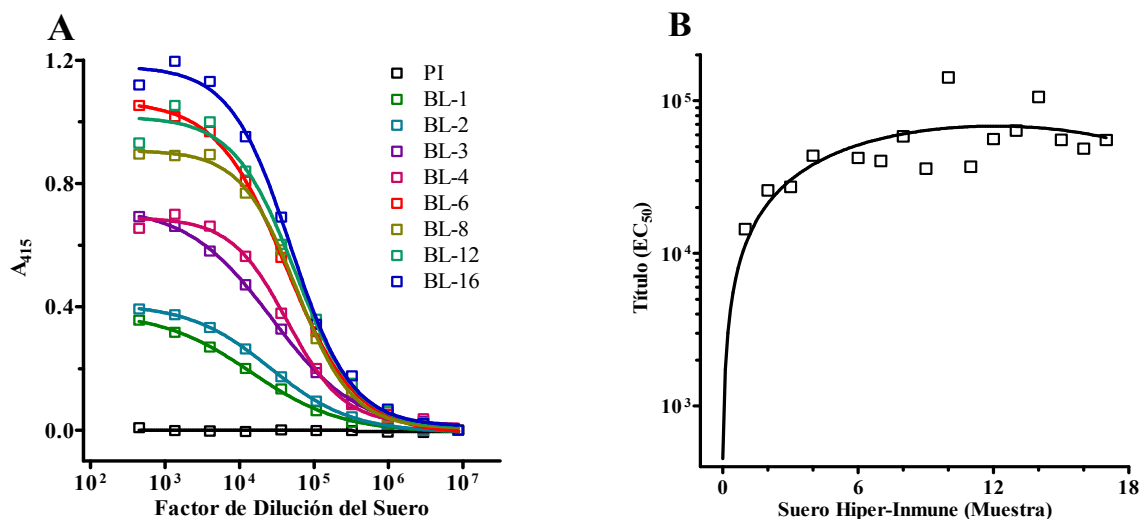


Figura 3. Producción de anticuerpos policlonales anti-*Ehp29*.

A. Curvas de titulación de anticuerpos anti-*Ehp29* en muestras de suero hiper-inmune. Gráfica de cambio absorbancia con respecto a la dilución del suero pre-inmune. El número del suero corresponde al orden en que fue obtenido (BL).

B. Curva de tendencia del título de anticuerpos anti-*Ehp29* durante el periodo de inmunización.

tendencia no lineal típica, con un patrón sigmoideo, tal como era esperado. Interesantemente, los resultados indican una reactividad significativa, con respecto a la respuesta del suero pre-immune, a partir del primer análisis del título de anticuerpos (BL1, 20 días posteriores a la primera inmunización), lo cual revela la producción inmediata de anticuerpos dirigidos contra la proteína *Ehp29* recombinante. Por otro lado, la Figura 3B indica una tendencia ascendente del título de anticuerpos, obteniéndose un valor máximo en la muestra 4 (BL4) y manteniéndose relativamente constante durante todo el periodo de inmunización. Este fenómeno fue valorado como positivo para los objetivos del proyecto, ya que la afinidad de los anticuerpos madura conforme el sistema inmunológico es retado con un antígeno por un periodo prolongado de tiempo [Neuberger *et al.*, 2000].

V.3 Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29*

Los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29* fueron purificados mediante un esquema secuencial de tres cromatografías de afinidad. La primera cromatografía se realizó con una resina acoplada a proteínas de *E. coli*, descartando todos aquellos anticuerpos que se pudieron haber generado contra proteínas bacterianas. La segunda cromatografía se llevó con una resina acoplada a la proteína A de *S. aureus*, permitiendo la separación de inmunoglobulinas de la clase IgG (ya que la proteína A presenta una fuerte afinidad por las regiones Fc de éstas). La tercera y última cromatografía se realizó con una resina acoplada a la proteína *Ehp29* recombinante, obteniendo solo la fracción de inmunoglobulinas IgG con afinidad específica contra la proteína recombinante. A partir de 12 mL de suero hiper-immune, se obtuvieron 10 mg de anticuerpos purificados; esto es, el esquema de la inmunización rindió 0.833 mg de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29* por cada mL de suero hiper-immune obtenido.

V.4 Caracterización de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29*

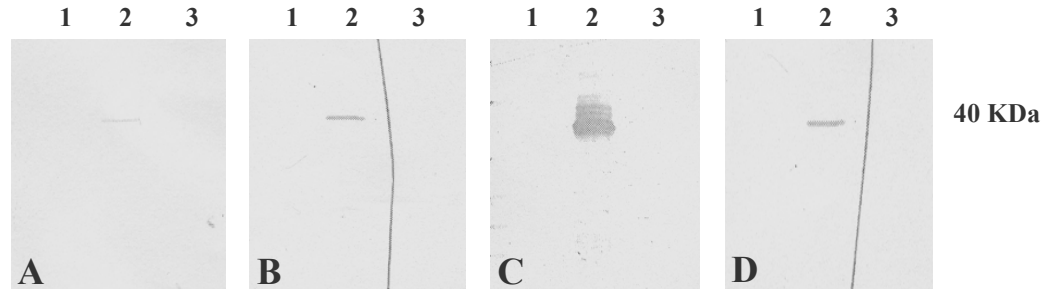


Figura 4. Análisis de la especificidad de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29* contra antígeno recombinante.

Muestras: 1, lisado total de *E. coli*; 2, *Ehp29* recombinante; 3, albúmina sérica bovina.

Reconocimiento primario: A, anticuerpo monoclonal anti-*Ehp29* FP10; B, anticuerpo monoclonal anti-poli-histidinas; C y D, anticuerpo policlonal mono-específico anti-*Ehp29*.

Para evaluar la reactividad y especificidad de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29* purificados se realizaron ensayos de inmunodetección (tipo *western blot*) contra antígeno recombinante. Como controles de especificidad, se utilizaron muestras de lisado bacteriano y de albúmina sérica bovina; además, como control de reactividad, se usaron diluciones de los anticuerpos monoclonales anti-*Ehp29* FP10 y anti-poli-histidinas. La Figura 4 muestra el resultado del reconocimiento molecular de antígeno inmovilizado. Como se puede observar, no existe evidencia de reconocimiento inespecífico de proteínas bacterianas (carril 1) y ni de albúmina sérica bovina (carril 3); por otro lado, es evidente una banda de ~40 KDa, consistente con la talla molecular de *Ehp29* (carril 2). Con respecto a la reactividad, la banda de reconocimiento de *Ehp29* es mucho más amplia e intensa en el reconocimiento primario con anticuerpos anti-*Ehp29* purificados (panel C) en comparación con el reconocimiento primario con los anticuerpos anti-*Ehp29* FP10 (panel A) y anti-poli-histidinas (panel B), evidenciando que los anticuerpos anti-*Ehp29* purificados son capaces de reconocer específicamente al antígeno recombinante. Además, un ensayo de competencia 1:100 (anticuerpo:antígeno), donde se esperaba saturar al anticuerpo con el antígeno, se observó una disminución de la reactividad (~80%, juzgado visualmente). Lo anterior sugiere que no se bloquearon completamente todos los sitios de unión a antígeno, debido posiblemente a que existe una mezcla heterogénea de anticuerpos (con una gama mixta de afinidades) y que es probable que aquellos de menor afinidad, aunque se encuentren

comprometidos con un antígeno, siempre estén dispuestos a separarse y unirse a otra molécula de antígeno (u otro epítipo) [Abbas *et al.*, 2000].

Para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-*Ehp29* de reconocer al antígeno nativo, se realizó un ensayo de inmunodetección de la peroxirredoxina presente en extractos de trofozoitos de *E. histolytica* y *E. dispar*. Inicialmente, la Figura 5 muestra evidencias del poder proteolítico de los extractos amibianos, ya que a pesar de los esfuerzos de mantener las condiciones experimentales libres de proteasas, la muestras presentan rastros de degradación; aun así, es posible observar el reconocimiento de una banda 30 KDa, consistente con el peso molecular de la peroxirredoxina amibiana [Reed *et al.*, 1992]. Como se puede observar, la intensidad de la banda de aumentó en correlación positiva con la concentración celular de *E. histolytica* (Figura 5A, carriles h2 – h20) y fue posible detectar al antígeno nativo presente en el extracto de 200 trofozoitos (Figura B); además, en un análisis comparativo simple, los anticuerpos reconocen al antígeno presente en extractos de *E. histolytica* y *E. dispar* (Figura 5A, carriles h20 – d40), lo cual era de esperarse por la alta homología entre ambas proteínas.

Para determinar cuantitativamente los límite inferior de detección de antígeno en extractos de *E. histolytica*, se realizó un análisis densitométrico de la proteína de 30 KDa. En la Figura 6 se puede observar una tendencia ascendente exponencial conforme aumenta la concentración de antígeno. Considerando el valor de intensidad obtenido para 40,000 trofozoitos como máximo, se determinó un valor de detección al 10% (D_{10}) de 2,344 de

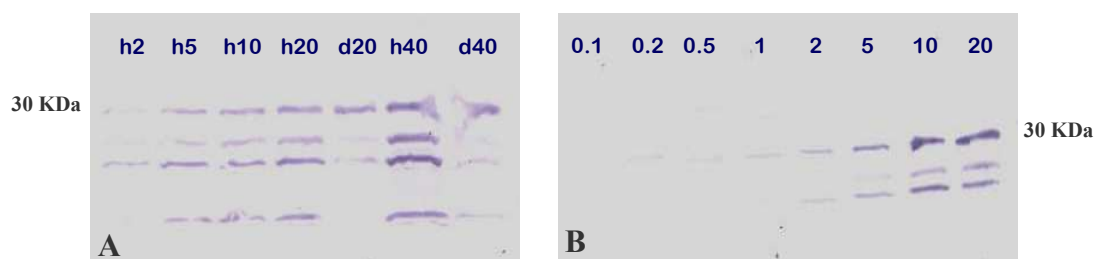


Figura 5. Análisis de especificidad de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*Ehp29* contra antígeno nativo.

A. Inmuno-reconocimiento de una proteína de 30 KDa en extractos proteicos de diferentes densidades celulares ($\times 10^3$) de *E. histolytica* (h2-h40) y *E. dispar* (d20 y d40).

B. Inmuno-reconocimiento de una proteína de 30 KDa en extractos proteicos de diferentes densidades celulares ($\times 10^3$) de *E. histolytica* (0.1-20).

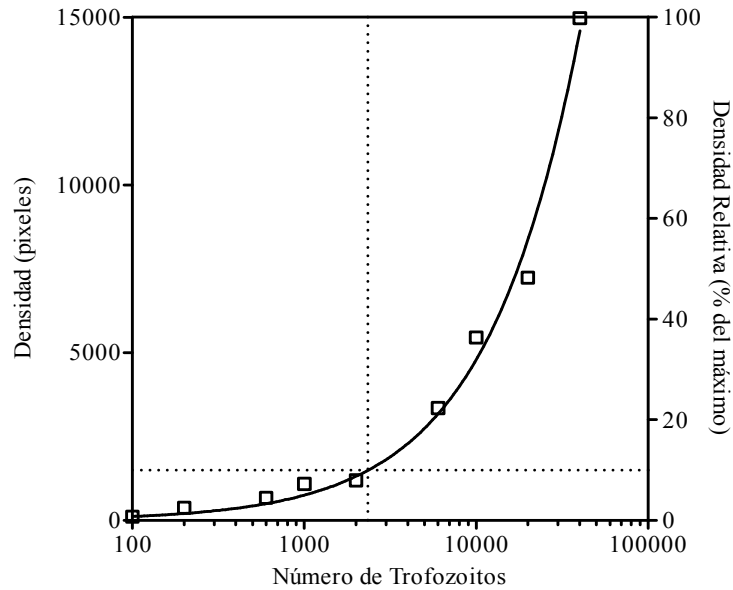


Figura 6. Determinación de los límites de detección de antígeno nativo en extractos celulares de *E. histolytica* mediante un análisis densitométrico.

células (utilizando una dilución 1:410 de los anticuerpos anti-*Ehp29* purificados).

V.5 Preparación de IgG anti-*Ehp29* acoplada a biotina

Inicialmente, ~10 mg de anticuerpos de clase IgG anti-*Ehp29* purificados se precipitaron con sulfato de amonio a una saturación final de 45%. La fracción precipitada se resolubilizó y dializó usando como solución amortiguadora a PBS, con el fin de eliminar las sales remanentes del proceso de precipitación. Después de este proceso, la concentración proteica fue de 7.8 mg/mL, obteniéndose 1.6 mL finales (~12.5 mg).

El inmunoensayo tipo ELISA de captura anti-*Ehp29* fue diseñado considerando dos anticuerpos: uno de captura de antígeno (inmovilizado en la microplaca) y otro derivatizado con biotina (como molécula reportera). Para este último, una fracción de anticuerpos IgG anti-*Ehp29* fueron derivatizados utilizando un estuche comercial. El sistema de reconocimiento biotina-estreptoavidina es muy útil debido a su especificidad y alta afinidad ($K_d = \sim 10^{15} M^{-1}$), por tal motivo es muy utilizado en técnicas inmuno-químicas con aplicaciones médicas. Siguiendo las indicaciones del fabricante, se obtuvieron 7.26 mg de

IgG anti-*Ehp29*-Biotina, con un coeficiente de 3; es decir, se tienen 3 moléculas de biotina por cada inmunoglobulina. Como ensayo control inicial, se determinó el título de los anticuerpos sin biotina (IgG anti-*Ehp29*) y con biotina (IgG anti-*Ehp29*-Biotina), obteniéndose valores de 4101 y 8630, respectivamente.

V.6 Evaluación del inmunoensayo tipo ELISA de captura anti-*Ehp29*

Para valorar la eficiencia y especificidad del complejo ternario formado entre la IgG anti-*Ehp29*, la *Ehp29* recombinante y la IgG anti-*Ehp29*-Biotina, se realizó un inmunoensayo tipo ELISA de captura considerando todas las posibles interacciones entre los componentes. Como se esperaba, solo la mezcla con todos los componentes dió reacción positiva (Anexo 6); incluso, la siguiente Tabla muestra los valores de intensidad normalizados, donde es evidente que ninguna de las otras mezclas rinde un valor de intensidad mayor al 4%. Con esto, se corrobora el reconocimiento específico y eficiente de cada uno de los componentes del inmunoensayo.

anti- <i>Ehp29</i>	<i>Ehp29</i>	Anti- <i>Ehp29</i> - Biotina	Intensidad de la Señal (%)
X	-	-	-0.30
-	X	-	-1.38
-	-	X	-2.61
X	X	-	-0.84
X	-	X	-3.50
-	X	X	3.20
X	X	X	100.00
-	-	-	0.00

V.7 Aplicación del inmunoensayo tipo ELISA de captura anti-*Ehp29* en la detección de antígeno recombinante y nativo

Para determinar la sensibilidad del inmunoensayo tipo ELISA de captura anti-*Ehp29*, se analizaron diluciones seriadas de la proteína recombinante y de extractos proteicos celulares solubles e insolubles de *Entamoeba histolytica* (Anexo 7). La Figura 7A muestra un comportamiento sigmoideo habitual en curvas de titulación de antígenos. A partir de un ajuste no lineal, por mínimos cuadrados, se calculó un valor de EC₅₀ de 200 ng, con límites de detección mínima (10%) y máxima (90%) de 10 y 4213 ng, respectivamente. De igual

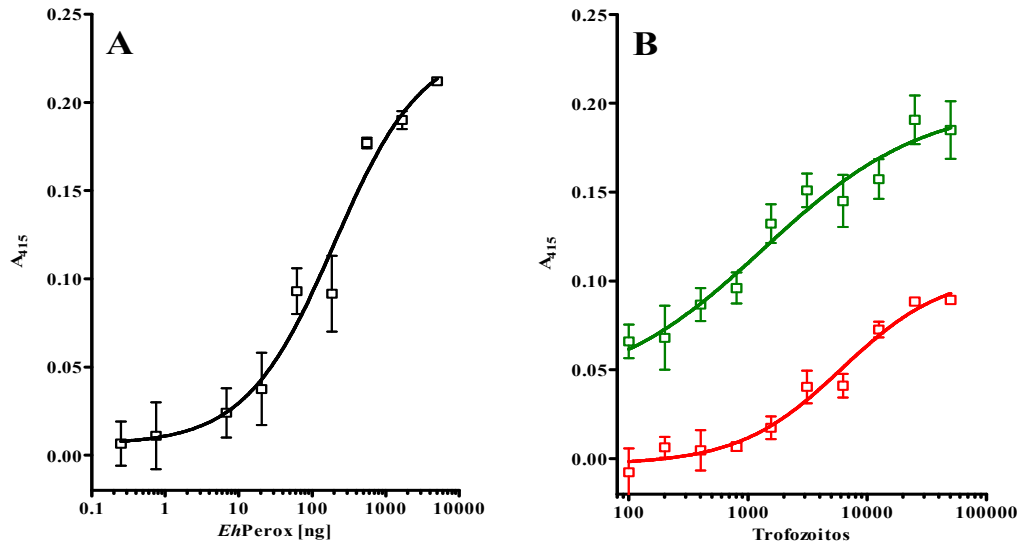


Figura 7. Detección de antígeno mediante el inmunoensayo tipo ELISA de captura anti-*Ehp29*.

A. Detección de *Ehp29* recombinante.

B. Detección de *Ehp29* nativa a partir de extractos solubles e insolubles de trofozoitos de *E. histolytica*. Verde, fracción soluble; Rojo, fracción insoluble.

manera, la Figura 7B muestra tendencias sigmoideas en el reconocimiento de *Ehp29* nativa en los extractos proteicos amibianos, observándose valores de detección menores en las fracciones insolubles, indicativo de la presencia de antígeno unido a membranas. A partir de un ajuste no lineal, por mínimos cuadrados, se calcularon los valores de EC_{50} de 1,348 y 6,113 células para las fracciones soluble e insoluble, respectivamente; indicando una eficiencia 4.5 veces mayor en la detección de *Ehp29* en extractos solubles. Además, se determinaron límites de detección mínima (10%) y máxima (90%) de 45 y 40500 trofozoitos, respectivamente.

V.8 Comparación del inmunoensayo tipo ELISA de captura anti-*Ehp29* con estuches comerciales

El inmunoensayo tipo ELISA de captura anti-*Ehp29*, el cual es capaz detectar la proteína nativa presente en extractos solubles de 45 trofozoitos de *E. histolytica*, es ~22 veces más sensible en comparación con la tira reactiva *Triage parasite panel* (BIOSITE

Diagnostics, San Diego, CA) que detecta la peroxirredoxina de *E.histolytica/E.dispar* (con una sensibilidad reportada de ~1,000 células); por otro lado, es ~5 veces más sensible en comparación con el *ProSpect* (*Alexon-Trend Inc.*, Ramsey, Minn.), el cual detecta al antígeno contenido en ~250 células. Cabe mencionar que esta comparación es totalmente teórica, ya que para establecer la sensibilidad comparativa real es necesario correr los ensayos *tête à tête* (cabeza con cabeza). Además, para validar la sensibilidad, precisión y exactitud del inmunoensayo tipo ELISA de captura anti-*Ehp29* es necesario evaluar muestras clínicas ciegas (positivas y negativas, en presencia/ausencia de otros microorganismos, *p.e.* parásitos, bacterias, hongos, etc.).

VI. CONCLUSIONES

La proteína *Ehp29* recombinante fue purificada favorablemente a partir de extractos bacterianos mediante un protocolo estándar de cromatografía de afinidad a níquel.

Los anticuerpos policlonales anti-*Ehp29* fueron producidos satisfactoriamente en un modelo animal mediante un esquema de inmunización típico, obteniéndose títulos mayores a 2 órdenes de magnitud, comparado con la muestra pre-inmune, al cuarto análisis de la título de anticuerpos.

Los anticuerpos policlonales (de clase IgG) mono-específicos anti-*Ehp29* fueron purificados exitosamente mediante un esquema secuencial de tres cromatografías de afinidad.

Los anticuerpos anti-*Ehp29* purificados son capaces de reconocer tanto al antígeno recombinante como al nativo de *E. histolytica*. Sin embargo, también exhiben reactividad cruzada contra antígeno nativo de *E. dispar*.

El inmunoensayo tipo ELISA de captura anti-*Ehp29* desarrollado reconoce específicamente hasta 10 ng de antígeno recombinante o antígeno nativo en extractos proteicos de 45 trofozoitos de *E. histolytica*.

El inmunoensayo tipo ELISA de captura anti-*Ehp29* representa la etapa inicial para el desarrollo de otros sistemas de detección de antígenos amibianos, específicamente una tira reactiva, que tendría la finalidad de igualar o mejorar la eficiencia de detección.

Debido a la naturaleza endémica del país, es imperante desarrollar ensayos reproducibles, económicos, sensibles y al alcance tecnológico de cualquier laboratorio con el fin de diagnosticar amibiasis, obtener datos epidemiológicos o dar seguimiento a pacientes *post*-infección. Ante esto, el ensayo desarrollado tiene el potencial para convertirse en una herramienta auxiliar en el diagnóstico presuntivo y seguimiento de la amibiasis.

VIII. REFERENCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4th ed. Philadelphia, PA: W. B. Saunders Co, 2000.
- Abd-Alla MD, Jackson TF, Reddy S, Ravdin J. Serum IgM antibody response to the galactose-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 59:431–434
- Abd-Alla MD, Jackson TF, Reddy S, Ravdin JI. Diagnosis of invasive amoebiasis by enzyme linked immunosorbent assay of saliva to detect amoebic lectin antigen and antilectin immunoglobulin G antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 38: 2344-2347.
- Adams EB, MacLeod IN. Invasive amebiasis. 1. Amebic dysentery and its complications. 1977; 56: 315-323.
- Bansal D, Sehgal L, Chawla Y, Chander R, Malla N. *In vitro* activity of antiamoebic drugs against clinical isolates of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Ann. Clin. Microbiol.* 2004; 3: 27.
- Blanck D, Sargeant PG. *Entamoeba histolytica* zymodemes: exhibition of gamma and delta bands only of glucose phosphate isomerase and phosphoglucomutase may be influenced by starch content in the medium. *Exp. Parasitol.* 1991; 72:87-90
- Bruchhaus I, Jacobs T, Leippe M, and Tannich E. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol. Microbiol.* 1996; 22: 255–263.
- Bruchhaus I, Richter S and Tannich E. Removal of hydrogen peroxide by the 29 KDa protein of *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* 1997; 326:785-789.
- Cheng XJ, Yoshihara E, Takeuchi T, Tachibana H. Molecular characterization of peroxiredoxin from *Entamoeba moshkovskii* and a comparison with *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 2004; 138: 195–203
- Choi, M., D. Sajed, L. Poole, K. Hirata, D. S. Herdman, B. E. Torian, and S. L. Reed. An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2005; 143: 80-89.
- Clark G, Diamond LS. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. *Clin. Microbiol. Rev.*, Jul 2002; 15: 329-341.

- Davis PH, Zhang X, Guo J, Townsend RR, Stanley SL Jr. Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. *Mol Microbiol.* 2006;**61**:1523–1532
- Diamond L, Clark, G. A Redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) Separating It from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Euk. Microbiol.* 1993; 40(3): 340-344.
- Diamond, L. S., D. R. Harlow, and C. C. Cunnick. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1978, 72: 431-432.
- Espinosa-Cantellano M, González-Robledo A, Chávez B, Castañón G, Argüello C, Lázaro-Haller A y Martínez-Palomo A. *Entamoeba dispar*: ultrastructure, surface, properties, and cytopathic effect. *J. Euk. Microbiol.* 1998; 45: 265-272.
- Espinosa-Cantellano ME, Martínez-Palomo AM. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 318-31
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriot D, Ellis J, Harkness J. PCR Detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in Stool Samples from Sydney, Australia. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 1035-1037.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J and Harkness J. Laboratory diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20: 511–532.
- Furrows SJ, Moody AH and Chiodini PL. Comparison of PCR and antigen detection methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J. Clin. Pathol.* 2004; 57: 264-266.
- García LS, Bruckner DA, Brever TC, Shimizu RY. Comparison of indirect fluorescent-antibody amoebic serology with counterimmunoelectrophoresis and indirect hemagglutination amoebic serologies. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 5: 603-605.
- Gaucher D, and Chadee K. Prospect for an *Entamoeba histolytica* Gal-lectin-based vaccine. *Parasite Immunology.* 2003; 25: 55–58.
- González-Ruiz A, Haque R, Aguirre A, Castañón G, Hall A, Guhl F, Ruiz-Palacios G, Miles MA, Warhurst DC. Value of microscopy in the diagnosis of the dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Pathol.* 1994; 41: 236-239.

- Griffith IP. The effect of cross-links on the mobility of proteins in dodecyl sulphate-polyacrylamide gels. *Biochem J.* 1972; 126(3): 553-60.
- Guo X, Houpt E, and Petri WA Jr. Crosstalk at the initial encounter: interplay between host defense and ameba survival strategies. *Curr. Opin. Immunol.* 2007; 19: 376-384.
- Haque R, Ali IK, Akther S, Petri W Jr. Comparison of PCR, Isoenzyme Analysis, and Antigen Detection for Diagnosis of *Entamoeba histolytica*. *Infection. J. clin. Microbiol.* 1998; 36: 449-452.
- Hetch O, Van Nuland N, Karin Schleinkofer K, Dingley A, Bruhn H, Leippe M y Grotzinger J. Solution Structure of the Pore-forming Protein of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 17834–17841.
- Hughes MA, Lee CS, Holm CF, Ghosh S, Mills A, Lockhart LA, Reed S, Mann B. Identification of *Entamoeba histolytica* thiol-specific antioxidant as a GalNac Lectin-associated Protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003; 127: 113-20.
- Katzwinkel-Wladarsch S, Loscher T, Rinder H. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994 :51(1);115-II 8
- Kelsall BL y Ravdin JI. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 1993; 168: 1319-1322.
- Laughlin RC and Temesvari LA. Cellular and molecular mechanisms that underlie *Entamoeba histolytica* pathogenesis: prospects for intervention. *Expert Rev Mol Med.* 2005; 7: 1-19
- McCoy JJ, Mann BJ, Petri Jr WA. Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. *Infect Immun.* 1994; 62:3045-50.
- Mirelman D, Nuchamowitz Y, Stolarsky T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35:2405-2407.
- Nickel R, Ott C, Dandekar T, Leippe M. Pore-forming peptides of *Entamoeba dispar*. Similarity and divergence to amoebapores in structure, expression and activity. *Eur J Biochem.* 1999;265:1002-07.

- Neuberger MS, Ehrenstein MR, Rada C, Sale J, Batista FD, Williams G, Milstein C. Memory in the B-cell compartment: antibody affinity maturation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2000; 355(1395): 357-60
- Ong SJ, Cheng MY, Liu KH, Horng CB. Use of the ProSpecT microplate enzyme immunoassay for detection of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* in faecal specimens. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1996; 90: 273-277.
- Petri WA Jr, Chapman MD, Snodgrass T, Mann BJ, Broman J and Ravdin JI. Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galctosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 304-3012.
- Petri WA Jr, Smith RD, Schlesinger PH, Murphy CF and Ravdin JI. Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Investig.* 1987; 80: 1238-1244.
- Pillai DR, Britten D, Ackers JP, Ravdin JI and Kain KC. A gene homologous to hgl2 of *Entamoeba histolytica* is present and expressed in *Entamoeba dispar*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1997; 87: 101-105.
- Pillai DR, Kain K. Immunochromatographic Strip-Based Detection of *Entamoeba histolytica-E. dispar* and *Giardia lamblia* Coproantigen. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:3017-3019.
- Poole LB, Chae HZ, Flores BM, Reed SL, Rhee SG, Torian BE. Peroxidase. Activity of a TSA-like antioxidant protein from a pathogenic amoeba, *Free Rad Biol Med.* 1997; 23:955-959
- Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2009; 106(6):1760-5.
- Reed S, Ember J, Herdman DS, DiScipio RG, Hugli TE y Gigli I. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J. Immunol.* 1995; 155: 266-274
- Reed SL, Flores BM, Batzer MA, Stein MA, Stroehrer VL, Carlton JE, Diedrich DL, Torian BE. Molecular and cellular characterization of the 29-kilodalton peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infect Immun.* 1992 Feb;60(2):542-9.

- Robinson GL. The Laboratory Diagnosis of human parasitic amoebae. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1968; 62: 285-94.
- Sanchez-Guillén MC, Velázquez-Rojas M, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado, Fuentes-Pérez R, Martínez-Munguía J, Talamás-Rohana P. Seroprevalence of Anti-*Entamoeba histolytica* antibodies by IHA and ELISA assay in blood donors from Puebla, México. *Arch. Med. Res.* 2000; 31: S53-S54.
- Sanuki J, Asai T, Okuzawa E, Kobayashi S, Takeuchi T. Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitol Res.* 1997; 83:96-98.
- Sargeant PG, Williams JE. Electroforetic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1979. 72: 225-227.
- Singh D, Naik SD and Naik S. Role of cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* in target cell death. *Parasitology.* 2004; 129:127-135.
- Torian BE, Flores BM, Stroehner VL, Hagen FS, Stamm WE. cDNA sequence analysis of a 29-kDa cysteine-rich surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990; 87: (16) 6358-6362
- Trissl DA, Martinez-Palomo A, De la Torre M, De la Hoz R, Pérez de Suarez E. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic Strains. *J. Exp. Med.* 1978; 148: 1137-1143.
- Van Doorn HR, Hofwegen H, Koelewijn R, Gilis H, Peek R, Wetsteyn J, Van Genderen JJP, Vervoort T, Van Gool T. Use of Rapid Dipstick and Latex Agglutination Tests and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of Amebic Liver Abscess, Amebic Colitis, and *Entamoeba histolytica* Cyst Passage. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 4801-4806.
- Visser LG, Verweij J, Esbroeck MV, Edeling WM, Clerinx J, Polderman AM. Diagnostic methods for differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in carriers: Performance and clinical implications in a non-endemic setting. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006; 296: 397-403.
- Winkelmann J, Leippe M, Bruhn H. A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;147:85-94.

- World Health Organization. Amoebiasis. Wkly. Epidemiol. 1997; 72:97-100.
- Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, González E, Valadez A, Hernández E, Valenzuela O, Limón A, Partida O y Silva E. Human Amebiasis: Breaking the Paradigm?. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2010; 7(3): 1105–1120.
- Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. Infect. Genet. Evol. 2009; 9: 1023–1032.
- Zeehaida M, Wan Nor Amilah WW, Amry A, Hassan S, Sarimah A, Rahmah N. A study on the usefulness of Techlab Entamoeba histolytica II antigen detection ELISA in the diagnosis of amoebic liver abscess (ALA) at Hospital University Sains Malaysia (HUSM), Kelantan, Malaysia. Trop Biomed. 2008; 25: 209-216.
- Zengzhu G, Bracha R, Nuchamowitz Y, Cheng W, Mirelman D. Analysis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Microbiol. 1999; 37:3034-3036

IX. ANEXOS

ANEXO 1. Electroforesis en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE (12% poliacrilamida).

1. Mezclar en dos tubos los reactivos para la preparación del gel separador (lower buffer, acrilamida, persulfato de amonio, TEMED®) y concentrador en las cantidades antes descritas con excepción del persulfato de amonio, que se agrega en el momento antes de colocar los geles en los cristales.
2. Limpiar los vidrios con SDS Para evitar posteriormente que los geles se peguen a este.
3. Ensamblar el molde para el gel utilizando vidrios de 0.75 mm de espesor aprox.
4. Agregar a la mezcla correspondiente para el gel separador. Con una pipeta, colocada en una de las esquinas superiores de los vidrios del molde para el gel, añadir un total de 3.5 ml aprox. de esta mezcla al molde. Inmediatamente agregar agua sobre el gel para evitar el contacto con el aire. Esperar a que gelifique.
5. Una vez que gelificó la mezcla correspondiente al gel separador, se descarta el agua inclinando el molde ensamblado. Luego de esto se le agrega al buffer concentrador. Se agrega de la misma manera que el buffer separador. La cantidad necesaria es aquella que se añade hasta que se rebalse del espacio entre los vidrios. Se coloca inmediatamente el peine para 0.75 mm. Esta mezcla gelifica aproximadamente en 30 minutos. Una vez solidificó se procede a quitar el peine deslizándolo suavemente.
6. Colocar en un tubo 10 µl de la muestra y 10 µl de azul de mercaptoeptanol, dilución 1:1. Tapar bien el tubo y colocarlo en incubación a 80°C durante 15 min.
7. Cargar las muestras en los pozos del gel (10 µl), con una micropipeta. En el primer pozo debe agregarse el marcador de PM como referencia 5 µl.
8. Llenar la cámara con el amortiguador de corrida. Colocar el gel en la cámara y correr las muestras a 80V primero, y una vez que hayan corrido por el gel concentrador se eleva a 120V (voltaje constante) hasta que el azul de bromofenol llegue casi al borde inferior del gel.
9. Separar los vidrios que contienen el gel con cuidado. Sacar el gel y eliminar la parte del gel espaciador.
10. Teñir el gel con colorante azul de *Coomassie*, sumergiéndolo durante toda una noche con agitación constante.
11. Pasado 24 horas aprox. después de la tinción, se quita el exceso de colorante con agua y se agrega solución de distinción (isopropanol/acido acético).

ANEXO 2. Diálisis

1. Se toma la muestra problema y se coloca (con la ayuda de un pipeta transfer) dentro de una bolsa de diálisis (3 500 Daltons, *Spectra/Por®Biotech, Spectrum Laboratories, Inc.*) que había sido previamente lavada e hidratada con buffer de bicarbonatos (NaHCO₃, 0.01 M, pH 9.5).
2. Posteriormente se coloco la bolsa dentro de un recipiente que contenía 100 mL de la misma solución de bicarbonatos (sumergida) en agitación constante.

3. Se mantuvieron estas condiciones durante un periodo de 24 horas en el que se realizaron dos cambios de buffer.

ANEXO 3. Purificación de anticuerpos anti-*Ehp29*

Cromatografía sepharose 4B-Proteína A (A _{280nm})						
Fracción	CA-1	CA-2	CA-3	CA-4	CA-5	CA-6
1	0.304	0.440	0.243	0.501	0.565	0.462
2	0.629	0.636	0.408	0.405	0.412	0.517
3	0.080	0.008	0.030	0.031	0.035	0.037
4	0.024	0.000	0.004	0.013	0.008	0.010
5	0.008	0.000	0.005	0.004	0.002	0.018
6	0.007	0.000	0.004	0.002	0.002	0.003
7	0.010	0.000	0.000	0.004	0.001	0.000
8	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Columna	Volumen (mL)	A _{280nm}	Concentración (A _{280 nm})(0.75 mg/ml*)
CA-1	8	3.42	2.56 mg/mL
CA-2	4	5.48	4.11 mg/mL
CA-3	4	3.75	2.79 mg/mL
CA-4	4	4.92	3.69 mg/mL
CA-5	4	5.06	3.79 mg/mL
CA-6	5	5.2	3.9 mg/mL

*Coeficiente de extinción molar (ε) = 0.75 mg/mL

Cromatografía con sefarosa 4B- <i>Ehp29</i> recombinante (A _{280nm})						
Fracción	CEh-1	CEh-2	CEh-3	CEh-4	CEh-5	CEh-6
1	0.226	0.376	1.426	1.871	0.350	0.437
2	0.398	0.620	0.421	0.670	0.529	0.826
3	0.263	0.295	0.209	0.346	0.300	0.369
4	0.158	0.187	0.177	0.257	0.220	0.252
5	0.101	0.122	0.100	0.199	0.183	0.205
6	0.095	0.100	0.081	0.169	0.177	0.100
7	0.044	0.097	0.076	0.102	0.113	0.134
8	0.039	0.069	0.065	0.094	0.112	0.113
9	0.030	0.056	0.072	0.007	0.097	0.128
10	0.011	0.060	0.059	0.002	0.006	0.100
11	0.000	0.002	0.004	0.002	0.005	0.002

Columna	Volumen (mL)	A280nm	Concentración (A280 nm)(0.75 mg/ml*)
CEh-1	18	0.127	0.095 mg/mL
CEh-2	13.5	0.167	0.125 mg/mL
CEh-3	15	0.225	0.168 mg/mL
CEh-4	14	0.31	0.232 mg/mL
CEh-5	15	0.196	0.147 mg/mL
CEh-6	15	0.259	0.194 mg/mL

*Coeficiente de extinción molar (ϵ) = 0.75 mg/mL

ANEXO 4

Análisis de las membranas de nitrocelulosa de el antígeno nativo con el programa ImageJ®

Número de células	Píxeles	
	<i>E. histolytica</i>	<i>E. dispar</i>
40000	14974.69	10094.154
20000	7241.1165	6111.25
10000	5456.185	–
6000	3352.52	–
2000	1194.795	–
1000	1088.55	–
600	676.55	–
200	379.9	–
100	110.7	–

ANEXO 5

Biotinización de anticuerpos anti-*Ehp29*. La siguiente tabla contiene los valores de absorbancia de las fracciones obtenidas de la columna de gel *Sephadex G-25M* (*Sigam-Aldrich*).

Fracción	A _{280 nm}	A _{500 nm}
1	0	0
2	0	0
3	1.567	0.018
4	1.871	0.051
5	0.054	0.015
6	0.0396	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0

	A _{280 nm}	A _{500nm}
Proteína muestra (diluida 1:10) 0.1 mL del pool biotinilado + 0.9 mL de PBS 1X	0.302	
HABA-Avidina 0.1 mL solución HABA (10 mM) + 3.2 mL de solución de avidina		0.959
Biotina muestra 0.9 mL HABA-avidina + 0.1 mL pool biotinilado* *previamente incubado 1.5 horas a 37°C con 10 µL de pronasa		0.691
HABA-control 0.9 mL de solución HABA-avidina + 0.1 mL de PBS		0.852
Coefficiente de extinción molar de IgG en 1 mg/mL (ϵ_{280})	1.4	
Coefficiente de extinción molar HABA/Avidin de una solución de biotina 1M (ϵ_{500})		34 000

$$\begin{aligned} \blacktriangleright \text{ Anticuerpos biotinilados (mg/mL)} &= \frac{A_{280 \text{ nm}} (\text{Factor de dilución})}{\epsilon_{280}} \\ &= \frac{0.338 (10)}{1.4} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Anticuerpos biotinilados} & 2.42 \text{ mg/mL} = 16.15 \text{ nmoles/mL} \\ & 7.26 \text{ mg en 3 mL totales} \end{aligned}$$

- Calcular la concentración de biotina (nmoles/mL)

$$\begin{aligned} \text{Valor corregido Biotina} &= (A_{500} \text{ Biotina muestra}) - (A_{500} \text{ HABA control}) \\ (A_{500 \text{ nm}}) &= (0.852) - (0.691) \\ &= 0.161 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Concentración de biotina} &= \frac{A_{500} \text{ biotina corregido} (10)(10^6 \text{ nmoles/mL})}{\epsilon_{500}} \\ &= \frac{(0.161) (10) (106 \text{ nmoles/mL})}{34\ 000} \\ &= 47.35 \text{ nmoles/mL} \end{aligned}$$

- Coeficiente Biotina: Proteína biotinilada

$$\begin{aligned} \text{Biotina : Proteína} &= \frac{\text{Biotina nmoles/mL}}{\text{Anticuerpos biotinilados nmoles/mL}} \\ \text{Cociente} &= \frac{47.35 \text{ nmoles/mL}}{16.15 \text{ nmoles/mL}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Biotina : Proteína} &= 3.01 \\ \text{Cociente} & \end{aligned}$$

ANEXO 6

Resultados del ensayo para evaluar el sándwich del ELISA diseñado.

Pocillo	A ₄₁₅	
	1	0.653
2	0.670	0.654
3	0.654	0.645
4	0.670	0.665
5	0.611	0.670
6	0.706	0.711
7	1.527	1.856
8	0.691	0.661
9*	0.686	0.699
10*	0.673	0.677

*controles negativo 1 y negativo 2

ANEXO 7

Resultados del ensayo para determinar la concentración mínima detectada de la peroxirredoxina recombinante.

Peroxirredoxina recombinante Concentración (ng)	A ₄₁₅		Promedio *	Normalizado **
	1	2		
5 000	0.846	0.852	0.849	0.204
1 666.6	0.830	0.824	0.827	0.182
555.5	0.815	0.813	0.814	0.169
185.2	0.748	0.709	0.729	0.083
61.7	0.715	0.745	0.730	0.085
20.5	0.652	0.697	0.675	0.030
6.8	0.645	0.677	0.661	0.016
2.3	0.659	0.770	0.715	0.000
0.75	0.627	0.669	0.648	0.000
0.25	0.629	0.658	0.644	0.000
Control A	0.635	0.639	0.637	0.000
Control B	0.622	0.640	0.631	0.000

Resultados del ensayo para determinar la concentración mínima detectada del antígeno nativo

Diluciones de extractos solubles de Eh A₄₁₅				Promedio *	Normalizado **
No. células	1	2	3		
50 000	0.795	0.852	0.832	0.826	0.181
25 000	0.803	0.839	0.854	0.832	0.187
12 500	0.774	0.808	0.814	0.799	0.154
6 250	0.755	0.795	0.809	0.786	0.141
3 125	0.780	0.782	0.815	0.792	0.147
1 560	0.750	0.779	0.792	0.774	0.129
800	0.721	0.734	0.757	0.737	0.092
400	0.714	0.720	0.750	0.728	0.083
200	0.688	0.691	0.749	0.709	0.064
100	0.694	0.698	0.730	0.707	0.062
Control A	0.639	0.640	0.645	0.641	0.000
Control B	0.637	0.600	0.640	0.626	0.000

Diluciones de extractos insolubles de Eh A₄₁₅				Promedio *	Normalizando **
No. células	1	2	3		
50000	0.723	0.724	0.722	0.723	0.078
25000	0.718	0.727	0.721	0.722	0.077
12500	0.706	0.716	0.697	0.706	0.061
6250	0.684	0.670	0.670	0.675	0.030
3125	0.680	0.660	0.682	0.674	0.029
1560	0.660	0.647	0.646	0.651	0.006
800	0.640	0.640	0.641	0.640	0.000
400	0.620	0.635	0.660	0.638	0.000
200	0.640	0.633	0.647	0.640	0.000
100	0.628	0.605	0.645	0.626	0.000
Control A	0.630	0.638	0.633	0.634	0.000
Control B	0.635	0.625	0.640	0.633	0.000

**A valor DO promedio (*) se resto el valor promedio OD de los controles (0.645)