

87
29.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD PROTECTORA EN LA
FORMACION DE ABSCESO HEPATICO AMIBIANO, DE LA
LIPOPEPTIDOFOSFOGLICANA DE ENTAMOEBIA HISTOLYTICA
EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE HAMSTER

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A:

ELENA ZAMBRANO GONZALEZ

MEXICO, D. F.

1988



EXAMENES PROMOCIONALES
FAC. DE QUIMICA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ACF	Adyuvante completo de Freund
AHA	Absceso hepático amibiano
Anti-LPFG	Suero inmune anti-lipopeptidofosfoglicana
D.O.	Densidad óptica
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
LIF	Factor inhibidor de la migración de leucocitos
LPFG	Lipopeptidofosfoglicana
LPS	Lipopolisacárido
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
SC	Suero de conejo
SSI	Solución salina isotónica

INDICE

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
MATERIAL Y METODOS	3
RESULTADOS	14
DISCUSION	29
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFIA	50

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1 Extracción y Purificación del antígeno polisacárido (LPFG)	16
Tabla 1 Resultados de ELISA (LPFG-antiLPFG) D.O. a 490 nm	30
Figura 2 Determinación de antigenicidad de la LPFG	31
Figura 3 Absceso hepático amibiano en hámster (Microabsceso +)	33
Figura 4 Absceso hepático amibiano en hámster (Absceso mediano ++)	33
Figura 5 Absceso hepático amibiano en hámster (Absceso grande +++)	34
Figura 6 Absceso hepático amibiano en hámster (Absceso muy grande ++++)	34
Figura 7 Elección del método para formar AHA	36
Figura 8 Estandarización de la dosis infectiva	37
Tabla 2 Relación entre sexo y características de los AHA formados	38
Tabla 3 Inmunización de LPFG en SSI	39
Tabla 4 Inmunización de LPFG con adyuvante	40
Tabla 5 Titulación de globulinas de cabra, anti- γ globulinas de hámster, conjugado a peroxidasa, por el método de ELISA D.O. a 490 nm	41
Figura 9 Titulación del conjugado de cabra anti- γ globulina de hámster	42

Tabla 6
Determinación de anticuerpos anti-LPFG en suero
de hámster

43

Figura 10
Determinación de anticuerpos anti-LPFG en suero
de hámster

44

útiles tanto en el desarrollo de métodos eficaces para el diagnóstico de la enfermedad, así como para el empleo en la elaboración de una posible vacuna. Dentro de estos estudios se encuentran los realizados por Isibasi y cols. (23). Ellos extrajeron una molécula de naturaleza polisacáridica, que denominaron lipopeptidofosfoglicana (LPFG); ésta demostró ser inmunogénica, por lo que despertó el interés de saber si podría participar en los mecanismos de protección del AHA.

Basado en lo anterior, este trabajo tiene como objetivo evaluar la actividad protectora de la LPFG, en la formación de abscesos hepáticos amibianos, utilizando un modelo experimental animal (hámsters).

ANTECEDENTES

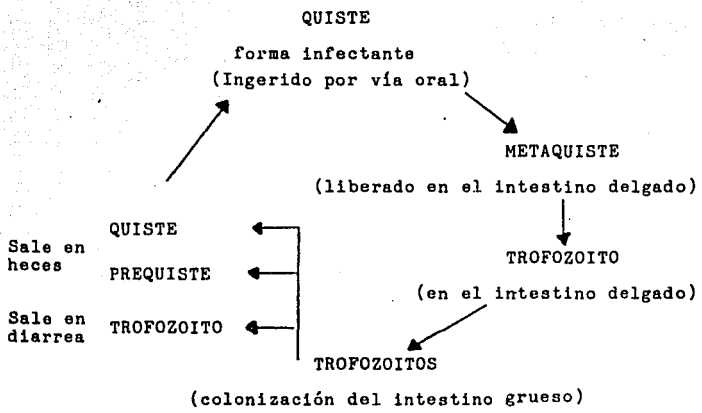
Definición de amibiasis

Se denomina amibiasis al estado resultante de albergar Entamoeba histolytica, con o sin manifestaciones clínicas (57). Es una enfermedad cosmopolita, se estima que afecta a un 10% de la población mundial, y su incidencia difiere de una región a otra (12, 57).

Etiología

El trofozoíto de E. histolytica (forma vegetativa), se aloja en el intestino, reproduciéndose por fisión binaria. Bajo condiciones desfavorables, los trofozoítos se diferencian en quistes (fase infectiva), y se eliminan en la materia fecal. La transmisión de un huésped a otro se realiza por vía oral, al ingerir los quistes en vehículos tales como agua y alimentos contaminados.

Ciclo biológico de E. histolytica



Trofozoito: es una fase altamente dinámica y pleomórfica, con movimientos característicos mediante la emisión de seudópodos rápidos, digitiformes, largos y anchos. Su tamaño en cultivo in vitro varía de 15 a 30 µm, dependiendo de las condiciones del medio. La membrana plasmática es similar a la de otras células eucarióticas, con una cubierta celular apenas detectable. El citoplasma contiene diferentes organelos: cuerpos densos, ribosomas y polisomas, gránulos osmiófilos, cuerpos helicoidales y cuerpos tubulares; vacuolas alimenticias y vesículas, cuyas membranas poseen la misma estructura que la membrana plasmática; presenta también lisosomas activos especializa-

dos de superficie. La amiba carece de mitocondria y aparato de Golgi, y su retículo endoplásmico consiste de vesículas finas rodeadas de algunos ribosomas. El núcleo es ovalado, con un nucleolo central y cromatina periférica. La envoltura nuclear presenta gran cantidad de poros.

Prequiste: cuando las condiciones del medio ambiente en las que se encuentra el trofozoíto son desfavorables para su vida, éste empieza a inmovilizarse, se desprende de los alimentos no digeridos, se reviste de una doble membrana refringente que le confiere resistencia, formándose así el prequiste. **Pre**presenta un sólo núcleo, además puede contener una masa de glucógeno y barras cromatoidales.

Quiste: conforme transcurre el tiempo, en el interior del prequiste hay actividad metabólica, por dos mitosis consecutivas de un núcleo se originan 4, quedando al final del proceso el quiste maduro. Este presenta una forma esférica u oval, -- con un diámetro de 8 a 20 μm , y una pared de 125 a 150 nm de grosor. Su membrana plasmática frecuentemente presenta profundas invaginaciones y en su citoplasma se observan polirribosomas, vacuolas y depósitos de glucógeno.

Metaquiste: en un medio neutro o ligeramente alcalino (y combinado con la acción de los jugos digestivos), se debilita la pared del quiste, y permite que la amiba multinucleada se escurra hacia el exterior por una pequeña hendidura de la pared que lo envuelve, liberándose así el metaquiste (26).

Patogenia

Entre los factores patogénicos de la amibiasis se pueden enumerar:

- 1) Colonización del intestino por una cepa amibiana virulenta.
- 2) Contactacto íntimo por adherencia a la mucosa intestinal.
- 3) Destrucción de las barreras intestinales por enzimas o productos tóxicos.
- 4) Lisis de las células intestinales y de las células inflamatorias del huésped, lo cual lleva a la interrupción de la mucosa intestinal, úlceras del colon, y a una posterior invasión de tejidos más profundos, y/o invasión de órganos -- más distantes, principalmente el hígado (42).

Diferenciación entre amibas patógenas y no patógenas

En análisis microscópico de heces fecales, de pacientes con amibiasis intestinal e individuos sanos, se encuentran frecuentemente quistes de E. histolytica: este hallazgo hizo pensar en la existencia de dos cepas amibianas: una patógena y otra no patógena, sin embargo, por la observación de las diferencias morfológicas de los quistes, no fue posible confirmar esa hipótesis, ya que los quistes provenientes tanto de individuos sanos como enfermos, presentaban las mismas características.

En 1968, Robinson (43) describió un método de cultivo monoxénico de amibas, que permitió transformar los quistes de E. histolytica en trofozoitos. Por el método de Robinson fue posible obtener grandes cantidades de trofozoitos. Este hecho -

permitió que Sargeant y Williams (44), empleando el comportamiento electroforético de 4 isoenzimas de la amiba, pudieran encontrar que la marca de patogenicidad está dada por el corrimiento electroforético en beta de la isoenzima fosfoglucomutasa y rápida en hexoquinasa. Además de separar amibas patógenas de no patógenas, Sargeant y cols. pudieron hacer una clasificación general de los trofozoítos, por lo que fue necesario emplear el término de zimodemo.

En la actualidad, la técnica de zimodemo es la única capaz de distinguir amibas patógenas de no patógenas, sin embargo, no es posible aplicarla en laboratorios de rutina, debido a su elevado costo.

Mecanismos inmunes contra la amiba

Los mecanismos inmunes humanos en contra del parásito, -- aún no han sido totalmente establecidos.

En la mayoría de los individuos infectados E. histolytica habita como un comensal y las condiciones que llevan al desarrollo de la enfermedad invasiva son multifactoriales y están relacionados con el balance entre los mecanismos patógenos del parásito y los mecanismos de defensa del huésped, ya sean estos inmunes o no.

En el huésped humano, E. histolytica es capaz de inducir una respuesta inmune tanto humoral como celular sin embargo, aún no se ha establecido cuál de estos mecanismos inmunes es el responsable de limitar la invasión amibiana o de proveer inmunidad en contra de la enfermedad invasiva recurrente (52).

La respuesta inmune humoral (27, 30) se desarrolla con la enfermedad invasiva, como lo demuestran estudios seroepidemiológicos, en donde del 81 a 100% de los pacientes con amibiasis intestinal o con AHA desarrollan anticuerpos IgG circulantes - específicos contra E. histolytica. Otros estudios demostraron la presencia de coproanticuerpos de la clase IgA en pacientes con amibiasis intestinal (13).

Una respuesta serológica positiva sólo es una indicación de la invasión por el parásito, ya sea presente o pasada, aunque regularmente los títulos más altos se presentan con el desarrollo reciente de la enfermedad invasiva, y la presencia de tales anticuerpos puede llegar a durar desde 9 hasta 11 años - (19, 20); no hay evidencias que indiquen que el título de los anticuerpos correlaciones con el estado clínico del paciente - (19).

Antígenos amibianos

La caracterización antigénica de E. histolytica, ha sido uno de los aspectos de mayor importancia en el estudio de la amibiasis.

En 1968, Diamond (9) describió el cultivo axénico de E. histolytica, lo que permitió un rápido avance de los estudios -- bioquímicos, inmunológicos y patológicos de la amibiasis.

Alikhan y Meerovitch (4) en 1968, empleando trofozoitos - sonicados de E. histolytica, obtuvieron bandas de precipitación tanto con sueros de pacientes, como con sueros de conejo anti- E. histolytica, y observaron reacciones de identidad con otras --

especies amibianas. Sin embargo, en 1969 Lunde y Diamond (33), al emplear antígeno total preparado mediante homogenización de trofozoítos cultivados axénicamente, establecieron patrones inmunolectroforéticos de diferentes cepas amibianas, y obtuvieron evidencias de que E. histolytica es inmunológicamente diferente de otras amibas de morfología similar. Más tarde, Alam y Ahmad (2), con técnicas similares, demostraron la heterogeneidad de la composición antigénica de los trofozoítos, y Krupp (31) mediante el empleo de pruebas inmunológicas con sueros de pacientes de diferentes regiones geográficas, identificó 14 antígenos en trofozoítos de E. histolytica.

Antígenos de superficie del trofozoíto

Se piensa que los antígenos de E. histolytica localizados en la superficie celular, son los más importantes para inducir la respuesta inmune, debido a que son los primeros en interactuar con el sistema inmune del huésped. La existencia e importancia de los antígenos de superficie ha sido demostrada con pruebas como: inmovilización del trofozoíto con suero inmune (5), por la unión del suero inmune fluoresceinado al trofozoíto intacto (7), y por la lisis de los trofozoítos mediada por anticuerpos y complemento (22). A partir de las últimas décadas comenzaron los estudios acerca de la naturaleza de estos antígenos.

En 1978, Perkhoush y cols. (45) demostraron que los principales antígenos de membrana de E. histolytica que son recono-

cidos por sueros de pacientes, son de naturaleza glicoproteica.

En 1980 Sawney y cols. (46), por medio de cromatografía - exclusión molecular, purificaron parcialmente un antígeno glicoproteico de la porción soluble del antígeno total de trofozoitos obtenidos por cultivo axénico de E. histolytica, esta molécula es de peso molecular elevado y con propiedades de hemaglutinación y precipitación, similares a las mostradas por el extracto crudo.

Por otro lado, Martínez Palomo y cols. (35), demostraron que la membrana plasmática de E. histolytica contiene residuos - de manosa y/o glucosa, ya que los trofozoitos en presencia de Concanavalina A se aglutinaban. En estudios posteriores, se reportó que esta aglutinación era de mayor intensidad con las cepas patógenas de E. histolytica, lo que sugiere la existencia de moléculas polisacáridicas sobre la superficie celular que - tuvieran relación con la patogenicidad. Se han reportado 2 moléculas diferentes que participan en la adherencia de los trofozoitos a las células de hámster, éstas pueden ser inhibidas por N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina respectivamente (36).

En 1980 Aley y cols. (3), desarrollaron una metodología - para la separación de las membranas plasmáticas de los trofozoitos de E. histolytica, basada en la unión específica de la - Concanavalina A, a los componentes glucoproteínicos de la membrana del trofozoito intacto, caracterizando así 6 glicoproteínas de la cepa HNI-IMSS y 4 de la cepa HK9:NIH.

En 1982, Isibasi y cols. (23) extrajeron una molécula de composición polisacáridica a partir de trofozoítos de E. histolytica cultivados axénicamente, el estudio químico de esta molécula indicó la presencia de azúcares aminados (glucosa, manosa, xilosa y galactosa) en un 89%, aminoácidos en un 8%, lípidos en un 2% y fosfatos en 1%, por lo cual la denominaron lipopeptidofosfoglicana (LPFG) (25). La localización de la LPFG se determinó por inmunofluorescencia indirecta e inmunoperoxidasa, encontrándose en la superficie de los trofozoítos de E. histolytica (24). Así mismo se han detectado anticuerpos anti-LPFG tanto de la clase IgM como de la clase IgG, en el suero de pacientes con AHA, también de la clase IgAs en el calostro de mujeres mexicanas en puerperio (41,1).

Se puede concluir de los datos existentes en la literatura que a la fecha no se ha purificado ningún antígeno de naturaleza proteica que participe en los mecanismos de protección y/o diagnóstico de la amibiasis. La falta de antígenos puros ha limitado la correcta interpretación de los estudios epidemiológicos (55). Aunque en los trabajos más recientes se ha efectuado la identificación de algunas proteínas de la membrana del trofozoíto, nadie ha aislado y caracterizado a ningún Ag. amibiano en particular, siendo la LPFG el único antígeno purificado con el que se cuenta.

Modelos experimentales de protección

En los estudios donde se utilizó el hámster como modelo -

experimental, se demostró que al deprimir la inmunidad celular con tratamientos con: esteroides, timentomía neonatal, esplenectomía, radiación, sílica, globulina antimacrófago o antilinfocítica, se provocaba un aumento en la formación de abscesos hepáticos (15, 16 y 17). En otros modelos se observó que había cierto grado de protección cuando se inmunizaba previamente con el bacilo de Calmette-Guerrin o cuando había existido una infección previa con Trichinella spiralis (37).

La inmunización previa con preparaciones proteicas amibianas confería resistencia a la amibiasis invasiva (47, 48, 51, 53 y 54).

Por otro lado, se encontró que los macrófagos de sangre periférica, células de bazo y células mononucleares peritoneales de hámster previamente inmunizados mataban a los trofozoítos in vitro. (18).

Antígeno crudo y trofozoítos vivos de E. histolytica indujeron inmunidad protectora contra la inoculación intrahepática de amibas virulentas en hámster (49). Se obtuvo también protección parcial, cuando se inoculó a hámster con suero humano inmune (50).

Todas estas observaciones indican que los mecanismos inmunes celulares son los responsables tanto de limitar el tamaño y diseminación de los abscesos hepáticos amibianos, como de evitar su recurrencia, lo que ha servido como base para efectuar los estudios en humanos.

Los antígenos amibianos más usados hasta la fecha han si-

do células completas y sus homogenizados, así como fracciones solubles o particuladas obtenidas a partir de los trofozoítos. Aún no se ha trabajado con un antígeno amibiano purificado para evaluar su actividad protectora.

ESQUEMA DE TRABAJO

OBTENCION DEL ANTIGENO

(LPFG)



INMUNIZAR HAMSTERS

RETO CON TROFOZOITOS DE

E. HISTOLYTICA

- _ Elección del método
- _ Estandarización de dosis infectiva
- _ Influencia del sexo

DETERMINAR ANTICUERPOS ANTI-

LPFG EN SUERO DE HAMSTER

- _ Obtención de anti- γ globulina de hámster conjugado a peroxidasa.

MATERIAL Y METODOS

I.- OBTENCION DE LOS ANTIGENOS

Cultivo de trofozoítos de Entamoeba histolytica

Se cultivaron trofozoítos de E. histolytica cepa HMI:IMSS - en medio axénico de Diamond (9). Posteriormente se cosechan - en su fase exponencial de crecimiento.

Obtención de la lipopeptidofosfoglicana

Los trofozoítos de E. histolytica son cosechados centrifugando a 1,000 xg durante 10 minutos. Dicho paquete es lavado 3 veces con solución salina isotónica (SSI, NaCl 0.85%). A -- continuación es sometido a lisis por congelamiento-descongelamiento, hasta que microscópicamente se observa ruptura total, posteriormente se realiza una ultracentrifugación a 100,000 xg durante 2 horas, y la pastilla es resuspendida en agua destilada.

Tanto la pastilla como el sobrenadante obtenidos de la ultracentrifugación se les hace una extracción con fenol de acuerdo con la técnica de Westphal-Jann (56), la cual consiste en - tratar ambas preparaciones con fenol al 90% 1:1 v/v (concentración final de fenol del 45%). La mezcla obtenida se somete a un calentamiento a 68°C durante 15 minutos en baño María, con agitación constante, se deja enfriar y centrifuga a 1,000 xg - durante 45 minutos, y se separa la fase acuosa de la fenólica.

La fase fenólica es desechada.

Las fases acuosas obtenidas (tanto de la pastilla como del sobrenadante) son dializadas exhaustivamente 3 días contra agua corriente y 1 día contra agua destilada, hasta eliminar los residuos de fenol. Posteriormente se someten a una ultracentrifugación a 100,000 xg durante 2 horas. Las fracciones de las pastillas se resuspenden en el menor volumen de agua -- destilada. Las 4 fracciones son liofilizadas y mantenidas a -20°C hasta su uso (figura 1).

Las fracciones Pa-S y S-S son las más ricas en polisacáridos antigénicos y presentan mínima contaminación de glucógeno (25). En el rendimiento final hay mayor cantidad de la fracción Pa-S, por tal razón se decidió trabajar con ésta. Para su uso en inmunizaciones se diluye en SSI (NaCl 0.85%) estéril a la concentración deseada.

EXTRACCION Y PURIFICACION DEL ANTIGENO POLISACARIDO (LPPG)

Trofozoitos de Entamoeba histolytica concentrados
(lavados 3 veces con SSI)

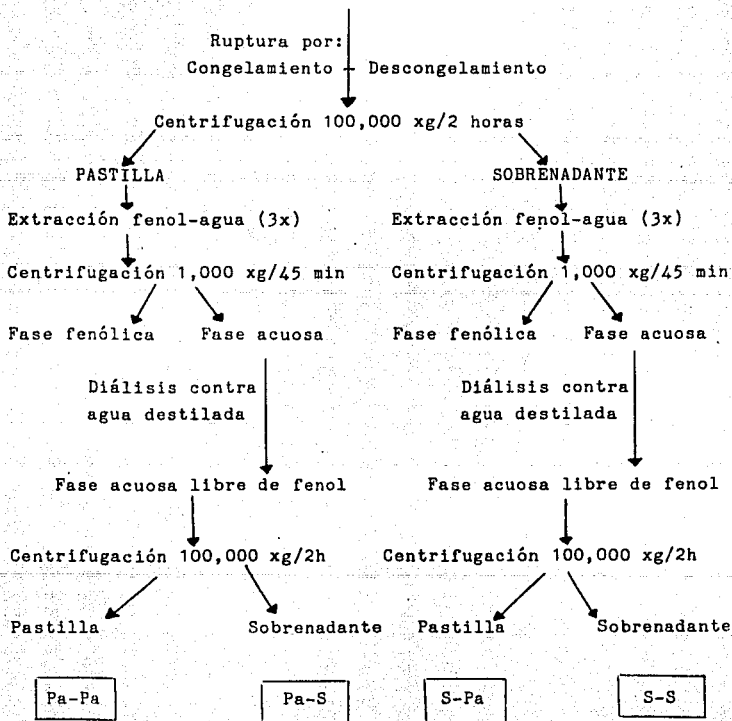


Figura 1.

Caracterización de la LPFG

a) Caracterización química:

- Para la cuantificación de carbohidratos, se utilizó la prueba del Fenol-sulfúrico (11), empleando una curva estándar con glucosa.

- La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (32), usando albúmina sérica bovina como estándar.

b) Caracterización inmunológica

Se realizó la prueba de ensayo inmunoenzimático (ELISA). Inmunizando conejos blancos Nueva Zelanda, de un peso promedio de 2 a 2.5 Kg. con LPFG, emulsificada en adyuvante completo de Freund (ACF), volumen 1:1, siguiendo el siguiente esquema de inmunización:

<u>Día</u>	<u>Inoculación intradérmica de LPFG</u>
0	2 mg. Sangría (control negativo)
15	1 mg.
22	1 mg.
29	1 mg.
36	1 mg.
43	1 mg.
50	1 mg.
57	1 mg.
64	1 mg.
71	Sangría de conejo.

Se procedió a centrifugar para obtener el suero anti-LPFG

Técnica de ELISA

Reactivos:

- Solución reguladora de recubrimiento, amortiguador de carbonatos 0.01 M, pH=9.6

Na₂CO₃ 7 g.

NaHCO₃ 2.8 g.

Agua aforar a 1 l.

- Solución reguladora de fosfatos-salina (PBS), NaCl 0.15 M, - fosfatos 0.01 M, pH=7.4

NaCl 8.5 g.

K₂HPO₄ 1.74 g.

KH₂PO₄ 1.46 g.

Agua aforar a 1 l.

- Solución bloqueadora PBS-Gelatina 1%

Gelatina bacteriológica 1 g.

PBS 100 ml.

- Solución de lavado PBS-Tween 0.1%.

Tween 20 0.1 ml.

PBS 100 ml.

- Solución diluyente PBS-Tween 0.1% - Gelatina

Tween 20 0.1 ml.

Gelatina bacteriológica 0.5 g.

PBS 100 ml.

- Solución reguladora para el sustrato, citratos 0.05 M, pH = 5.6
 - Citrato de sodio 29 g.
 - Ac. cítrico 4.1 g.
 - Agua aforar a 1 l.
- Sustrato para peroxidasa
 - O-fenilendiamina 6 mg.
 - H₂O₂ al 30% 0.01 ml.
 - Regulador de citratos 12 ml.
- Solución bloqueadora para el sustrato, H₂SO₄ 2.5 N.
 - H₂SO₄ concentrado 69.4 ml.
 - H₂O aforar a 1 l.

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (NUNC - Immunoplate I, Dinamarca).

Se usó LPFG a las siguientes concentraciones: 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 y 0.195 µg/ml. Los pozos se recubrieron con cada una de estas concentraciones.



▲ LPFG en 100 µl de solución amortiguadora de carbonatos.

Después de 12 horas de incubación a temperatura ambiente, se colocó 100 µl de solución PBS-Gelatina en todos los pozos, durante 1 hora. Posteriormente es agregado el suero anti-LPFG en un volumen de 100 µl en las siguientes diluciones: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600. Se dejó incubando duran-

te 2 horas a 37°C.



▲ anti-LPFG
▲ Ag

Pasado este tiempo, las placas son lavadas 3 veces con - PBS-Tween. Después del último lavado se les agregó el conjugado de suero de cabra anti- γ globulina total de conejo unida a - peroxidasa, diluido 1:1000 en PBS-Tween-Gelatina (0.1 ml en cada pozo). Todo lo anterior se mantuvo por 2 horas a 37°C.



▲ anti- γ globulina unida a peroxidasa

Una vez lavadas las placas, es agregado el sustrato para peroxidasa. Este se dejó incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente y al final la reacción se detuvo con una gota de H₂SO₄ 2.5 N. Las placas fueron leídas a 490 nm en un aparato de ELISA (Minireader II, dinattec, Virginia, USA).

Pozos testigos:

- Pozo # 9 : testigo del suero.
- Pozo # 10: testigo del antígeno.
- Pozo # 11: testigo del conjugado.

Obtención del antígeno crudo

Los trofozoítos de E. histolytica se cosechan centrifugando

a 1,000 xg durante 10 minutos. El paquete de amibas es lavado 3 veces con SSI (NaCl 0.85%), para posteriormente someter a -- congelamiento-descongelamiento hasta que se observa microscópicamente ruptura total de los trofozoitos.

Se determina cantidad de proteínas por el método de Lowry (32), y Bradford con azul de Coomasie G-250 (6), en ambos casos el estándar es albúmina sérica bovina.

II.- FORMACION DE AHA A TRAVES DE LA INOCULACION DE TROFOZOITOS DE E. histolytica

Animal de experimentación

Se utilizaron hámster dorados de Siria (Mesocricetus auratus) de ambos sexos, mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Higiene.

Inóculo

Cosecha de amibas en su fase logarítmica de crecimiento y ajuste a diferentes concentraciones por ml según cada experimento.

Método intrahepático para producir AHA

El animal se anestesia por vía intramuscular con pentobarbital sódico 6.3 mg por cada 100 g. de peso, posteriormente es rasurado el abdomen y desinfectada la región con isodine.

Se hace una incisión longitudinal en la cavidad abdominal de aproximadamente 1 cm. El hígado se expone para inocularle

ambas lentamente con una jeringa hipodérmica. Al retirar la jeringa lentamente, en el lugar de la lesión se coloca una pequeña torunda mojada en SSI (NaCl 0.85%). Una vez controlada la hemorragia se retira la torunda y se cierra la pared abdominal, primero cosiendo el peritoneo con Catgut calibre #00 y -- después la piel con seda.

Método de inoculación en vena porta para producir AHA

Se mantiene el hámster en ayuno, 12 horas previas a la cirugía; se anestesia, rasura y desinfecta para luego hacer una incisión longitudinal en la cavidad abdominal de aproximadamente 4 cm. Con una torunda mediana mojada en SSI, se acomodan los intestinos sobre el abdomen, de tal manera que sea más fácil la localización de la vena porta. Con SSI se humedecen constantemente dichos órganos para que no haya deshidratación. Una vez localizada la vena porta, se inoculan lentamente las amibas a través de una jeringa hipodérmica. En el lugar de la lesión se coloca un fragmento de esponja de gelatina (Gelfoam), para que al retirar la aguja no haya hemorragia abundante. - Posteriormente hay que cerrar la pared abdominal.

Sacrificio de los hámsters

Terminada la operación, los animales son aislados. Transcurrida una semana, el hámster es sacrificado en cámara de éter, con el fin de abrir el abdomen y observar la formación de AHA.

III.- ENSAYOS PARA DETERMINAR EL MEJOR METODO DE FORMACION DE AHA

Se utilizaron 16 hámster por experimento, con un peso promedio de 90 g. y una edad de 7 a 8 semanas.

<u>Método</u>	<u>No. de hámsters</u>	<u>Dosis de trofozoítos</u>
Intrahepático	4	1×10^6 / 150 μ l.
Intrahepático	4	5×10^5 / 75 μ l.
Vena porta	4	1×10^6 / 150 μ l.
Vena porta	4	5×10^5 / 75 μ l.

La prueba se repitió 2 veces.

IV.- ESTANDARIZACION DE LA DOSIS INFECTIVA

Se utilizaron 18 hámsters por experimento, con un peso promedio de 90 g. y una edad de 7 a 8 semanas.

La vía de inoculación fue intrahepática.

<u>No. de hámsters</u>	<u>Dosis de trofozoítos</u>
6	2×10^6 / 300 μ l.
6	1×10^6 / 150 μ l.
6	5×10^5 / 75 μ l.

La prueba se repitió 5 veces.

V.- DETERMINACION DE LA RELACION ENTRE SEXO Y CARACTERISTICAS DE LOS AHA FORMADOS

Se utilizaron 24 hámsters por experimento, con un peso promedio de 90 g. y una edad de 7 a 8 semanas.

La vía de inoculación fue intrahepática.

<u>No. de hámsters</u>	<u>sexo</u>	<u>Dosis de trofozoítos</u>
6		1×10^6 / 150 μ l.
6		1×10^6 / 150 μ l.
6		2×10^6 / 300 μ l.
6		2×10^6 / 300 μ l.

La prueba se repitió 5 veces.

VI.- INMUNIZACION DE HAMSTERS CON LPFG

-- Esquema de inmunización con SSI

Se utilizaron 30 hámsters, con un peso promedio de 70 g. y una edad de 4 a 5 semanas.

<u>Día inmunización</u>	<u>LPFG (μg/100 μl)</u>	<u>Reto con trofozoítos</u>
0 intraperitoneal	10, 50 y 100	- - -
7 intraperitoneal	10, 50 y 100	- - -
14 - - -	- - -	1×10^6 vía intrahepática
21	Sacrificio de los animales.	

Como grupos testigos se emplearon:

1) Hámsters inoculados con trofozoítos de E. histolytica - 1×10^6 el día del reto.

2) Hámsters inmunizados con SSI estéril, de acuerdo al es-
quema de inmunización, y retados con 1×10^6 de trofozoítos de
E. histolytica.

- Esquema de inmunización con adyuvante

Se forma una emulsión de 1 mg de LPFG más 1 mg de Al(OH)₃
(como adyuvante).

<u>Día</u>	<u>inmunización</u>	<u>LPFG (mg)</u>	<u>Reto con trofozoítos</u>
0	intraperitoneal	1	- - -
7	intraperitoneal	1	- - -
14	intraperitoneal	1	- - -
21	- - -	- - -	1×10^6 vía intrahepática
28	Sacrificio de los animales.		

Como grupos testigos se emplearon:

1) Hámsters inmunizados con Al(OH)₃ (1.7 mg/ml SSI), de a-
cuerdo al esquema de inmunización, y retados con 1×10^6 trofo-
zoítos de E. histolytica

2) Hámsters inmunizados con antígeno total: se forma una
emulsión de Ag total (extracto de amiba completo) más 1.7 mg -
de Al(OH)₃, en un volumen final de 1 ml.

3) Hámsters inoculados con trofozoítos de E. histolytica -
 1×10^6 .

VII.- DETERMINACION Y TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-LPFG EN -
SUERO DE HAMSTER INMUNIZADO

Obtención del conjugado de hámster

- Se obtuvieron γ globulinas de hámster por precipitación al 33% con sulfato de amonio. La cuantificación de proteínas fue determinada por el método de Lowry (32), utilizando como estándar albúmina sérica bovina.

- Se inmunizó una cabra de un peso aproximado de 25 Kg - con globulinas de hámster (1 mg/Kg de peso), emulsificado en ACF, volumen 1:1, siguiendo el siguiente esquema de inmunización:

<u>Día</u>	<u>Inoculación intradérmica de γglobulinas de hámster</u>
0	30 mg.
7	30 mg.
14	30 mg.
21	30 mg.
28	Sangría de cabra

Se procedió a centrifugar para obtener el suero y posteriormente purificar las γ globulinas por precipitación al 33% con sulfato de amonio.

- Preparación del conjugado con peroxidasa

Se disolvieron 10 mg. de peroxidasa en 0.2 ml de glutaral dehidro al 1%, en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH = 6.8 . - La preparación es mantenida por 18 horas a temperatura ambien-

te para posteriormente filtrar por una columna de Sephadex - G-25 (fino), equilibrada con SSI al 0.85%. Se recolectaron - las fracciones coloreadas (rojizas) que contenían la peroxidasa.

Las γ globulinas anti-hámster, previamente dializadas contra SSI 0.85%, se concentraron a 5 mg/ml. Se adicionó a la solución de peroxidasa 1 ml de γ globulinas anti-hámster, para - posteriormente agregar 0.1 ml de amortiguador de carbonatos 1M a pH = 9.5, se mantiene la preparación por 24 horas a 4°C.

Finalmente después de adicionar 0.1 ml de solución de lisina 1 M, se dializa contra PBS durante 12 horas.

Titulación del conjugado por ELISA

Se utilizó γ globulinas de hámster a una concentración de 1 mg/ml, y formar diluciones seriadas de: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200, en amortiguador de carbonatos.

Se agregó el conjugado en las siguientes concentraciones: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:3200, diluido en amortiguador PBS-Tween-Gelatina.

Pozos testigos:

- Pozo H : testigo de antígeno.
- Pozo 12: testigo de conjugado.

Titulación de anticuerpos anti-LPFG en suero de hámster.

Previo al reto con trofozoítos de E. histolytica, se obtu -

vieron 2 ml de sangre de los hámsters que siguieron el esquema de inmunización de LPFG con adyuvante.

Por el método de ELISA, se determinó la presencia de anticuerpos anti-LPFG de los sueros de hámster inmunizados:

El antígeno (LPFG), se fijó en placas de poliestireno, a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, colocando 100 μl por pozo.

Se agregaron los sueros de hámster en las siguientes diluciones: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600, en amortiguador PBS-Tween-Gelatina, (100 μl por pozo):

- 1) Sueros de hámster inmunizados con LPFG
- 2) Suero de hámster inmunizados con Ag. total.
- 3) Suero de hámster normal (testigo negativo).

Como control positivo se utilizó suero de conejo anti-LPFG.

Los conjugados a utilizar fueron los respectivos para conejo y hámster.

RESULTADOS

Caracterización química de los antígenos

Lipopeptidofosfoglucana

- Determinación de carbohidratos por el método de fenol - sulfúrico: 78%.
- Determinación de proteínas por el método de Lowry: 5%.

Antígeno total

- Determinación de proteínas por el método de Lowry: 4.2 mg/ml.
- Determinación de proteínas por el método de Bradford: 4.1 mg/ml.

Caracterización inmunológica de la LPFG

Los resultados de la ELISA se encuentran en la tabla 1 y en la figura 2. Como puede observarse en ellos, el antígeno responde con altos títulos a una concentración baja.

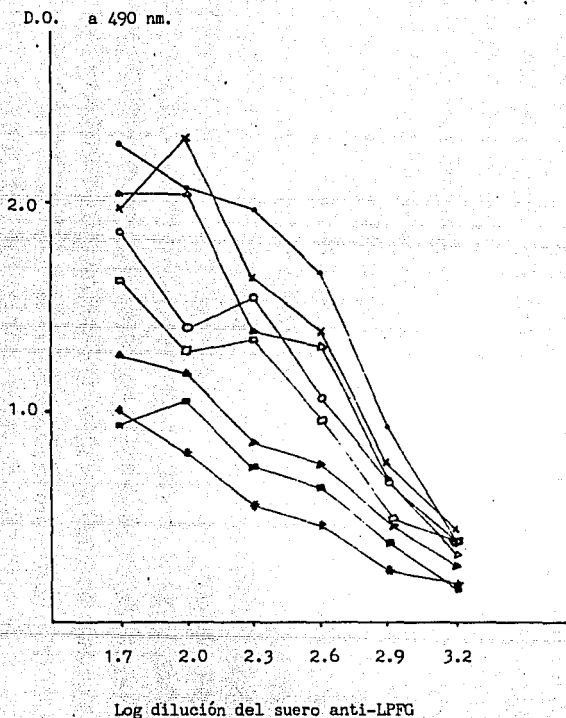
Dilución de LPFG (Ag)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A	2.26	1.99	2.03	1.85	1.62	1.23	0.93	0.96	0.25	0.27	0.00	A
H	2.04	2.30	2.04	1.40	1.29	1.19	1.07	0.80	0.18	0.18	0.00	B
C	1.98	1.63	1.36	1.53	1.36	0.84	0.73	0.55	0.16	0.15	0.00	C
D	1.67	1.36	1.31	1.03	0.99	0.75	0.63	0.49	0.12	0.14	0.01	D
E	0.81	0.75	0.69	0.68	0.49	0.45	0.38	0.24	0.10	0.10	0.00	E
F	0.40	0.43	0.31	0.37	0.37	0.28	0.19	0.20	0.07	0.09	0.01	F
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	

Dilución de suero anti-LPFG (ac)

Resultados de ELISA (LPFG-antiLPFG) D.O. a 490 nm

Tabla 1.



Determinación de la antigenicidad de la LPFG

Concentración de LPFG: • 50 ug/ml; × 25 ug/ml; ▲ 12.5 ug/ml; ◻ 6.25 ug/ml;
 ▲ 3.125 ug/ml; ◼ 1.56 ug/ml; * 0.78 ug/ml y ◼ 0.195 ug/ml.

Figura 2.

CLASIFICACION DE LOS AHA EN EL HAMSTER (magnitud)

Para describir las lesiones hepáticas, se clasificaron los AHA en 4 tipos diferentes:

- + Microabscesos: Solamente uno, caracterizado por una área bien circunscrita, pequeña, de color blanco y de consistencia dura.

- + + Abscesos medianos: De 2 a 3 abscesos, localizados en un solo lóbulo y caracterizado por áreas circunscritas, de aproximadamente 3 mm, de color blanco y de consistencia dura.

- + + + Abscesos grandes: De 2 a 3 localizados en el mismo lóbulo (confluentes o aislados), de color blanco-amarrillento, de consistencia dura, además con adherencia al diafragma y las asas intestinales (extensión de las lesiones).

- + + + + Abscesos muy grandes: Múltiples abscesos en todos los lóbulos, con necrosis total del lóbulo inoculado. El hígado presentaba además numerosas adherencias con el diafragma, la pared abdominal y las asas intestinales.



Figura 3. Absceso hepático amibiano en hámster
(Microabsceso +).



Figura 4. Absceso hepático amibiano en hámster
(Absceso mediano ++).



Figura 5. Absceso hepático amibiano en hámster
(Absceso grande + + +).



Figura 6. Absceso hepático amibiano en hámster
(Absceso muy grande + + + +).

Elección del método para formar AHA

Los resultados se encuentran en la figura 7.

Forma de los abscesos:

Los hámsters inoculados por vía intrahepática, en general formaron abscesos del tipo grande (+ + +); mientras que los inoculados por la vena porta foraron abscesos del tipo muy grande (+ + + +).

En algunos de los hámsters inoculados de manera intravenosa, hubo infección de la herida quirúrgica.

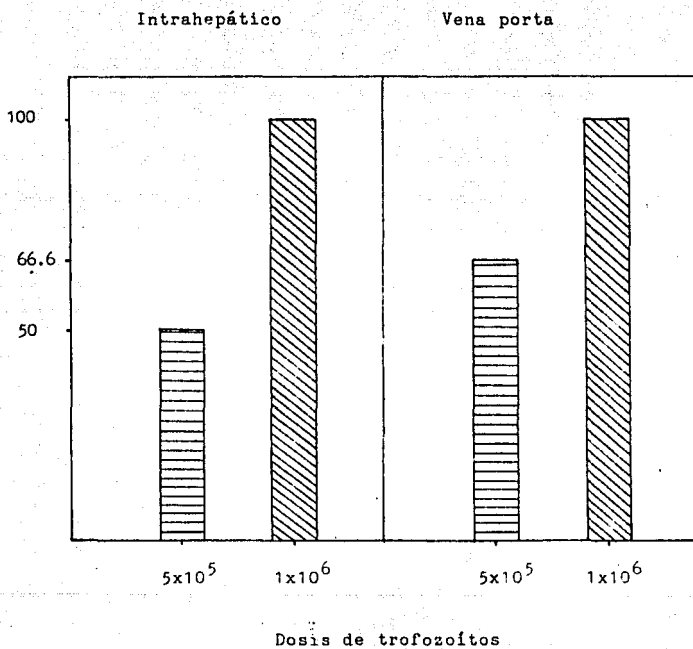
Estandarización de la dosis infectiva

Los resultados se encuentran en la figura 8.

Forma de los abscesos:

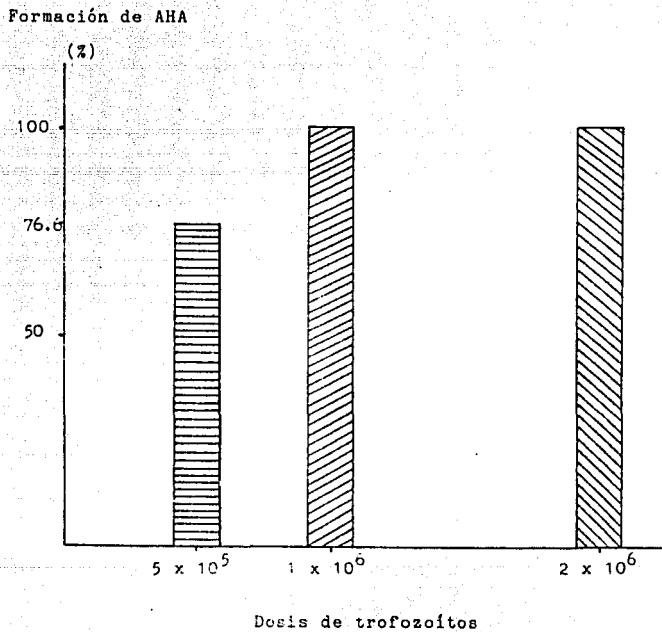
Con la dosis 2×10^6 así como 1×10^6 se formaron abscesos del tipo grande (+ + +) en su mayoría y solamente algunos del tipo muy grande (+ + + +) y mediano (+ +).

Con la dosis 5×10^5 se formaron abscesos del tipo mediano (+ +), algunos del tipo grande (+ + +) y algunos del tipo microabsceso (+).



Elección del método para formar AHA

Figura 7



Estandarización de la dosis
infectiva

Figura 8.

Relación entre sexo y características de los AHA formados

El sexo no influyó en la incidencia y magnitud de los AHA formados por inoculación intrahepática de trofozoítos de E. histolytica. Tabla 2.

Dosis de trofozoítos <u>E. histolytica</u>	Sexo	AHA (%)		Magnitud de AHA (%)			
		-	+	+	++	+++	++++
1 x 10 ⁶		0	100		50	33.3	16.6
1 x 10 ⁶		0	100		50	50	
2 x 10 ⁶		0	100		33.3	50	16.6
2 x 10 ⁶		0	100			66.6	16.6

Tabla 2.

Inmunización de LPFG en SSI

Grupo inmunizado	AHA (%)		Magnitud de AHA (%)			
	-	+	+	++	+++	++++
Testigo negativo	0	100		25	75	
SSI	0	100			66.6	33.3
10 µg LPFG	0	100		20	20	60
50 µg LPFG	0	100			33.3	66.6
100 µg LPFG	0	100			25	75

Tabla 3.

Immunización de LPFG con adyuvante

	AHA (%)		Magnitud de AHA (%)			
	-	+	+	++	+++	++++
Testigo negativo	0	100	33.3	66.6		
Adyuvante	0	100	25	50	25	
Ag. total	25	75		50	25	
1 mg LPFG	0	100			75	25

Tabla 4.

Dilución del conjugado

	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	1.76	1.47	1.01	0.68	0.28	0.14	0.09	0.00	A
B	1.61	1.32	0.88	0.60	0.19	0.13	0.05	0.00	B
C	1.53	1.24	0.84	0.56	0.21	0.13	0.04	0.00	C
D	1.26	0.97	0.76	0.55	0.17	0.12	0.03	0.00	D
E	1.19	0.98	0.66	0.42	0.16	0.10	0.04	0.01	E
F	1.15	0.86	0.57	0.30	0.12	0.05	0.03	0.00	F
G	1.10	0.81	0.57	0.26	0.12	0.05	0.02	0.00	G
H	0.21	0.16	0.14	0.14	0.09	0.08	0.09	0.00	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	

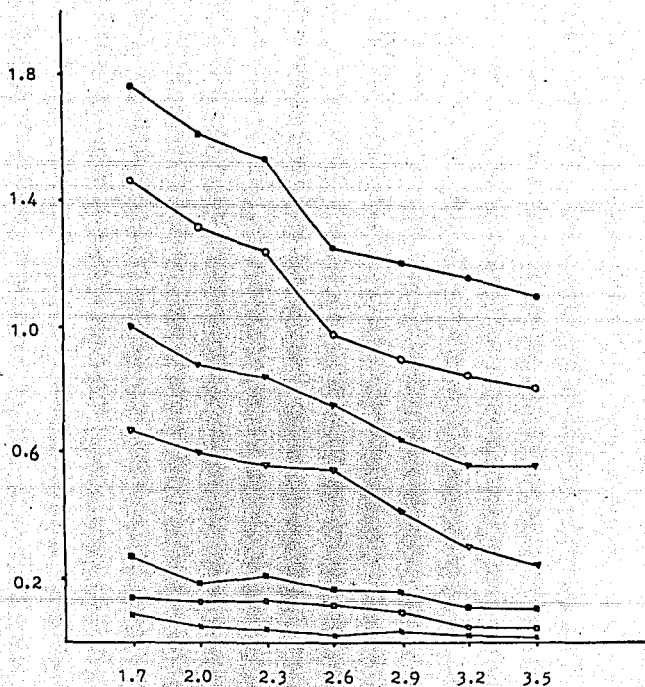
Dilución de γ globulinas de hámster

* Titulació de γ globulinas de cabra, anti- γ globulinas de hámster, conjugado a peroxidasa (*conjugado de cabra-anti-hámster), por el método de ELISA.

D.O. a 490 nm

Figura 9.

D. O.

Log dilución γ globulinas de hámster

Titulación del conjugado de cabra anti- γ globulinas de hámster

Dilución del conjugado: ● 1:50, ○ 1:100, ▲ 1:200, △ 1:400,
 ■ 1:800, ◆ 1:1600 y ◻ 1:3200.

Dilución	LPFG		Ag. total		Testigo		S. C. anti-LPFG
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	
1:25	0.134	0.01	0.118	0.04	0.140	0.03	0.42
1:50	0.084	0.02	0.132	0.03	0.092	0.04	0.32
1:100	0.110	0.04	0.118	0.03	0.084	0.05	0.25
1:200	0.094	0.02	0.108	0.01	0.076	0.05	0.23
1:400	0.092	0.02	0.096	0.01	0.080	0.03	0.17
1:800	0.048	0.02	0.078	0.02	0.044	0.03	0.07
1:1600	0.060	0.03	0.052	0.02	0.044	0.02	0.02

Determinación de anticuerpos anti-LPFG en suero de hámster

por el método de ELISA D.O. a 490 nm

\bar{x} = media de los sueros

σ = desviación estándar

LPFG = sueros inmunizados con LPFG

Ag. total = sueros inmunizados con Ag. total (extrato de amiba).

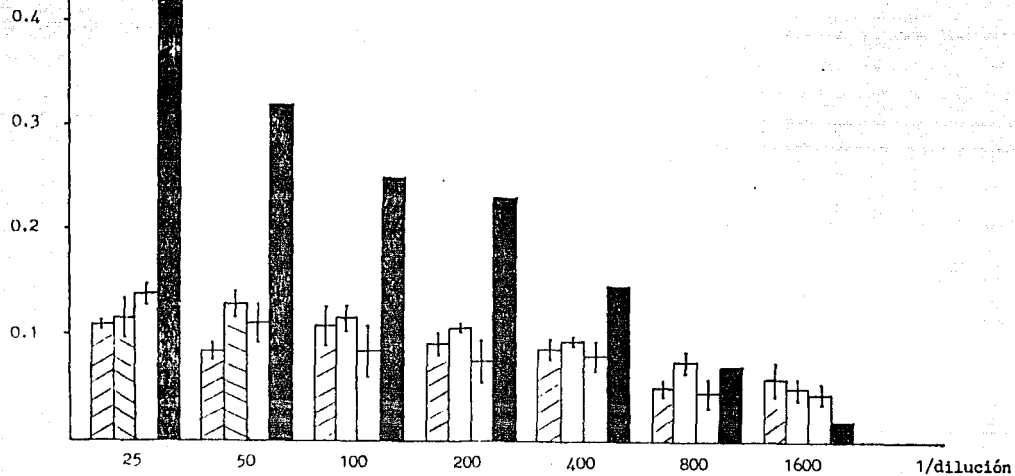
Testigo = suero de hámster no inmunizado

S.C. anti-LPFG = suero de conejo anti-LPFG (+).

Tabla 6.

D.O. a 490 nm

Determinación de anticuerpos anti-LPFG
en suero de hámster



Suero de hámster: inmunizado con LPFG; inmunizado con Ag. total; testigo negativo;
 Suero de conejo anti-LPFG (+).

Figura 10.

DISCUSION

La membrana citoplasmática de E. histolytica contiene glicoproteínas y glicolípidos. La lipopeptidofosfoglicana (LPFG) - es un glicolípido con propiedades inmunogénicas durante la amibiasis invasiva, pues se encuentran anticuerpos específicos de isotipo IgM, IgG e IgA contra ella en el suero de pacientes -- con absceso hepático amibiano (41). Además hay IgA de secreción anti-LPFG en el calostro de mujeres normales durante el puerperio fisiológico (1). La LPFG tiene la capacidad de estimular a los linfocitos de pacientes con AHA produciendo factor inhibidor de la migración de leucocitos (LIF) (8). Los antecedentes previos y el hecho de que la LPFG esté situada en la superficie (24), hacen de ella un antígeno interesante para estudiar su comportamiento inmunológico en un modelo animal.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de la LPFG de inducir protección en la formación de abscesos amibianos en el hígado de hámsters.

Los resultados del estudio fueron los siguientes:

a) 1 mg de LPFG administrada por vía intraperitoneal en hidróxido de aluminio como adyuvante, no estimuló en el hámster la formación de anticuerpos específicos (medidos por ELISA) en el tiempo que se estudió

b) La inmunización con antígeno total de amiba, bajo el -

mismo esquema que la LPFG, tampoco indujo la producción de anticuerpos anti-LPFG.

c) Ambos antígenos aparentemente bajo estas condiciones, fueron incapaces de inducir protección en la formación de AHA.

Las razones por las cuales la LPFG no estimuló la producción de anticuerpos específicos, podrían ser las siguientes:

1) Que el número de inmunizaciones y la cantidad de antígeno administrado no fueran suficientes para inducir una respuesta inmune humoral. Esto resulta poco probable, pues otros polisacáridos, a las mismas concentraciones que las empleadas con la LPFG son capaces de estimular una respuesta inmune con producción de anticuerpos específicos (28).

2) La inducción de tolerancia a dosis altas de antígeno. Esta posibilidad se puede descartar, ya que la inducción de tolerancia específica se obtiene con inmunizaciones de hasta -- 10 mg de antígeno por día (21). En el esquema de inmunización empleado con los hámsters, las inmunizaciones fueron de 1 mg - de LPFG cada semana.

3) Otra posibilidad es que la respuesta inmune hacia la LPFG se encuentre bajo el control genético y los hámster co - rrespondan a las especies incapaces de montar respuesta hacia la molécula. Este tipo de regulación se ha descrito para o - tros polisacáridos bacterianos en otras especies animales (29).

4) La producción de anticuerpos específicos anti-LPFG en pacientes con AHA, así como en mujeres en puerperio fisiológico, se debe probablemente a que la LPFG se encuentra en asociaciones de tipo iónicas fuertes con proteínas de la membrana citoplasmática de la amiba. Algo semejante ocurre con el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram negativas y las proteínas de membrana externa (40). Si lo anterior es cierto, se puede formar la hipótesis de que se forme un complejo acarreador-hapteno (39) y bajo esta forma la región polisacárida activaría al linfocito B, mientras que la parte proteica activaría a los linfocitos TCD4. Estos linfocitos activados secretarían IL-4, IL-5 e IL-6, moléculas indispensables para la diferenciación de linfocitos B activados a células plasmáticas formadoras de anticuerpos (10). Una posibilidad en la falta de respuesta humoral en los hámsters hacia la LPFG, es que durante el proceso de purificación se pierden los péptidos necesarios en la inducción de la respuesta inmune. Lo anterior se apoya en el hecho de que la molécula purificada no es capaz de estimular la proliferación de linfocitos de sangre periférica en pacientes con AHA (14).

La falta de respuesta humoral a la LPFG es la causa probable de su incapacidad para actuar como inmunógeno protector. Sin embargo, en un futuro deberá evaluarse el papel que juegan los anticuerpos anti-amiba, en la inmunidad protectora. Para esto deberá trabajarse con el modelo experimental de hámsters, administrando en forma pasiva suero heterólogo humano o de co-

nejo, anti-amiba total o anti-LPFG.

Por otro lado, se ha sugerido que la respuesta inmune celular es el mecanismo más importante para obtener inmunidad -- protectora en algunas parasitosis (38). Los polisacáridos no activan el sistema inmune celular. Si en un futuro se desea -- de nuevo analizar el papel de la LPFG como antígeno capaz de -- inducir protección, ésta deberá ser acoplada a una proteína -- con el fin de estimular tanto la respuesta inmune humoral como la celular, simulando así lo que ocurre en forma natural duran te la infección.

CONCLUSIONES

- 1.- Bajo el esquema de inmunización utilizado, la lipopeptido-fosfoglicana, aislada de Entamoeba histolytica, no estimuló - la formación de anticuerpos específicos en el hámster.

- 2.- La LPFG no indujo protección en la formación de abscesos - hepáticos amibianos en el hámster, al ser éstos retados -- con trofozoítos de E. histolytica.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acosta, G. (1986) Determinación de anticuerpos anti-lipopeptidofosfoglicana de E. histolytica de la clase IgAs, - en calostro humano. Arch. Invest. Med. (Mex) 13, Supl. 3, 63-68.
- 2.- Ahmad, S. y Bisati, S. (1976) In vitro interaction between Entamoeba histolytica and humoral antibodies. B. Sepúlveda y L. S. Diamond (Eds). Procedimiento de la Conferencia Internacional de Amibiasis, Instituto Mexicano - del Seguro Social, México, D.F. pp 540-545.
- 3.- Aley, S. B., Scott, W. A. y Cohn, Z. A. (1980) Plasma - membrane of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152, 391 - 404.
- 4.- Alikhan, Z. y Meerovitch, E. (1970) Studies on the purification of E. histolytica antigen by gel filtration. Some physiochemical properties of the isolated fraction. Can. J. Microbiol. 16, 493-498.
- 5.- Beltran, F., Biagi, F., Ortega, P. L. y Rivas, C. (1965) Observaciones sobre la reacción de inmunofluorescencia y la reacción de inmovilización de E. histolytica. Rev. Gastroenterología. Mex. 30, 491-496.
- 6.- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Annal Biochem. 72, 248.
- 7.- Calderón, J., Muñoz, M. L. y Acosta, H. M. (1980) Surface redistribution and release of antibody induced caps in Entamoebae. J. Exp. Med. 151, 184-193.

- 8.- Cruz, M. S. (1988) Inmunoquímica de un antígeno de naturaleza polisacáridica de la superficie de Entamoeba histolytica. Tesis de doctorado. Escuela Nacional de Ciencias biológicas. I.P.N
- 9.- Diamond, L. S. (1968) Techniques of axenic cultivation of E. histolytica like amebae. J. Parasitol. 54, 1047- - 1056,
- 10.- Dinarello, C. A. y Mier, J. W. (1987) Lymphokinas. N. - Eng. J. Med. 317, 940-945.
- 11.- Dubok, M, Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Roberts, P. A. y Smith, E. (1956) Colorimetric method for determina - tion of sugars and related substances. Annal. Chem. 28, 350-356.
- 12.- Elsdon-Dew, R. (1968) The epidemiology of amoebiasis. Adv. Parasitol. 6, 1-62.
- 13.- Elsdon-Dew, R. (1970) The serology of amoebiasis. -- Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 64, 18.
- 14.- Galindo, N., Ortiz, V., Blanco, F., Isibasi, A. (1988) Incapacidad de la lipopeptidofosfoglicana aislada de E. histolytica de estimular la proliferación de linfocitos. - XXI Congreso Nac. de Microbiología. Monterrey, N. L.
- 15.- Ghadirian, E. y Meerovitch, E. (1981) Effect of immuno- suppression on the size and metastasis of amoebic liver - abscesses and metastatic foci in hamsters. Infect Immun. - 31, 571-573.
- 16.- Ghadirian, E. y Meerovitch, E. (1981) Effect of immuno- suppression on the size and metastasis of amoebic liver - abscesses in hamsters. Parasite. Immunol. 3, 329-338.
- 17.- Ghadirian, E. y Meerovitch, E. (1982) Macrophage re - quirement for host defense against experimental hepatic a

- moebiasis in the hamster. Parasite. Immunol. 4, 219 - 225.
- 18.- Ghadirian, E. y Meerovitch, E. (1982) In vitro amoebicidal activity of immune cells. Infect Immun. 36, 243-246.
 - 19.- Healy, G. R., Kagan, I. G. y Gleason, N. N. (1970) Use of the indirect hemagglutination test in some studies of seroepidemiology of amebiasis in the Western hemisphere. Health Lab. Sci. 7, 109-116.
 - 20.- Healy, G. R., Visvesvara, G. S. y Kagan, I. G. (1974) - Observations on the persistence of antibodies to E. histolytica. Arch. Invest. Med. (mex) 5 Supl. 2, 495-500.
 - 21.- Howard, T. G. y Mitchison, N. A. (1975) Immunological - tolerance. Prog. Allergy, 18-43.
 - 22.- Huldt, G., Davies, P., Allison, A. C. y Schorlemmer, H. - U. (1979) Interactions between Entamoeba histolytica and complement. Nature. 277, 214-216.
 - 23.- Isibasi, A., Cruz, M. S., Ramírez, A. y Kumate, J. (1982) Inmunquímica de una lipopeptidofosfoglicana extraída de trofozoítos de Entamoeba histolytica cepa HK9 cultivados en medio axénico, utilizando el método del fenol-agua. Arch. Invest. Med. (Mex). 13, Supl. 3, 51-55.
 - 24.- Isibasi, A., Cruz, M. S., Soto, M., Ramírez, A. y Kumate, J. (1982) Localización en los trofozoítos de E. histolytica de una lipopeptidofosfoglicana extraída por fenol-agua de la cepa HK-9. Arch. Invest. Med. (Mex) 13, Supl. 3, 57-62.

- 25.- Isibasi, A., Cruz, M. S., Cottlieb, M. y Kumate, J. -- (1986) Purificación de la porción polisacáridica de la lipopeptidofosfoglicana extraída de trofozoítos de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex) 17, Supl/1, - 73-79.
- 26.- Jeffrey, H. C. y Leach, R. M. (1975) Atlas of medical - helminthology and Protozoology. Churchill Livingstone eds. Edinburgh London. Second edition. pp 50.
- 27.- Juniper, K., Worrel, C. L., Minshew, M. C., Roth, L. S., Cypert, H. y Lloyd, R. E. (1972) Serological diagnosis of amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21, 157-167.
- 28.- Killion, J. W., Morrison (1970) Protection of C3H/He mice from lethal S. typhimurium LT2 Infection by Immunization with lipopolysaccharide - Lipid A. Associated Protein - Complexes. Infect. Immun. 54, 1-8.
- 29.- Knecht, J. C., Schiffman, G. y Austrian, R. (1970) Some biological properties of Pneumococcus type 37 and the chemistry of its capsular polysaccharide. J. Exp. Med. - 132, 475.
- 30.- Kotcher, E., Miranda, M., García de Salgado, V. (1970) Correlation of clinical, parasitological and serological data of individuals infected with Entamoeba histolytica. Gastroenterology. 58, 338-391.
- 31.- Krupp, I. M. (1966) Immuno-electrophoretic analysis of several strains of E. histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15, 849-854.
- 32.- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. y col. -- (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Bio. Chem. 3, 73.

- 33.- Lunde, M. N., Chaparas, S. D. y Diamond, L. S. (1969) - Skin test potency in guinea pigs of E. histolytica antigen (histolyticin) prepared from axenically cultivated amoe- bae. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130, 455-458.
- 34.- Martínez-Palomo, A. (1982) The biology of Entamoeba histo- lytica. Research Studies Press/John Wiley, Chichester. pp. 11-31.
- 35.- Martínez-Palomo, A., González-Robles, A. y de la Torre, M (1973) Selective agglutination of pathogenic strains of Entamoeba histolytica induced by concanavalin A. Nature New Biology. 245, 186-187.
- 36.- Martínez-Palomo, A., Pinto de Silva, P. y Chávez, B. - (1976) Membrane structure of Entamoeba histolytica: Fine - structure of freeze-fractured membranes. Journal of Ul - trastructural Research, 54, 148-158.
- 37.- Meerovitch, E. y Ghadirian, E. (1980) Effect of Trichine- lla spiralis infection on the experimental amebis liver - abscess in hamsters. Arch. Invest. Med. (Mex) 11, Supl 1, 185-188.
- 38.- Mitchell, G. (1980) Responses to Infection with Metazoon and Protozoan Parasites in Mice. Advances in Immunology, 28, 451-465.
- 39.- Moller, G. (1980) Supresión y tolerancia a los haptenos 50, 110-120.
- 40.- Osborn, M. J., Wu, H. C. (1980) Proteins of the outer - membrane of gram negative bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 34, 369-432.

- 41.- Pacheco, J. M. (1988) Determinación de anticuerpos anti lipopeptidofosfoglicana de E histolytica en el suero de - pacientes con absceso hepático amibiano, usando un método inmunoenzimático (ELISA). Tesis de Licenciatura. FES- - Cuautitlán, UNAM.
- 42.- Raudin, J. I. (1986) Pathogenesis of disease caused by Entamoeba histolytica. Studies of adherence, secreted toxins and contact dependent cytolysis. Revs. Infect. Dis. 8, 247-260.
- 43.- Robinson, G. L. (1968) The laboratory diagnosis of hu - man parasitic amoebae. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 62, 285-294.
- 44.- Sargeant, P. G. Y Williams, J. E. (1979) Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 73, 225-227.
- 45.- Sargeant, P. G., Williams, J. E. y Grene, J. D. (1978) The differentiation of invasive and non-invasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis. Transactions of the Royal Society of Trop. Med. Hyg. 72, 469-474.
- 46.- Sawhney, S., Chakravarti, R. N., Jain, P. y Vinayak, V. K. (1980) Immunogenicity of axenic Entamoeba histolytica antigen and its fractions. Transactions of the Royal Society of Trop. Med. Hyg. 74, 26-29.
- 47.- Sepúlveda, B., Arroyo, Begovich, A., Tanimoto-Weki, M., - Martínez-Palomo A. y Ortiz-Ortiz, L. (1978) Simposio: Inducción de inmunidad protectora antiamebiana con nuevos antígenos en el hámster con antígeno obtenido de cultivo axénico de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex) 2, - Supl. 1, 289-294.

- 48.- Sepúlveda, B., Tanimoto-Weki, M., Vázquez-Saavedra, J. A. y Lunde, L. (1971) Inducción de inmunidad antiambiana en el hámster con antígeno obtenido de cultivo axénico de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex), 5, Supl. 2, -- 441-446.
- 49.- Sepúlveda, B., Arroyo-Begovich, A., Tanimoto-Weki, M. Martínez-Palomo, A. y Ortiz-Ortiz, L. (1978) Inducción de inmunidad protectora antiambiana con "nuevos" antígenos en el hámster lactante. Arch. Invest. Med. (Mex) 9, - Supl. 1, 309-328.
- 50.- Sepúlveda, B., Tanimoto-Weki, M., Calderón, P. y de la Hoz R. (1974) Inducción de inmunidad pasiva antiambiana en el hámster por la inyección de suero inmune. Arch. Invest. Med. (Mex) 5, Supl. 2, 451-456.
- 51.- Tanimoto-Weki, M., Vázquez-Saavedra, J. A., Calderón, Lara Pand, Aguirre-García, J. (1973) Inmunidad consecutiva a la inyección de antígeno ambiano axénico en el hámster. Arch. Invest. Med. (Mex), 4, Supl. 1, 147-154.
- 52.- Trissl, D. (1982) Immunology of Entamoeba histolytica in - human and animal hosts. Rev. Infect. Dis. 4, 1154-1184.
- 53.- Vázquez Saavedra, J. A., Tanimoto-Weki, M. Olivera-López, J. L., Caracheo, R. F. y Cortés-Arcos, A. (1973). Inmunidad consecutiva a inyección ambiana cruzada en el hámster. Arch. Invest. Med. (Mex) 4 Supl 1, 155-158.
- 54.- Vinayak, V. K., Sawhney, S., Jain, P. y Chadravarti, R. K. (1980) Protective effects of crude and chromatographic fractions of axenic cultivate of E. histolytica in guinea - pigs. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 483-487.

- 55.- Walsh, A. J. (1986) Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8, 228-238.
- 56.- Westphal, O., A. K. Jann. (1965) Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol water and further applications of the procedure. Methods in Carbohydrate Chemistry. 5, 83.
- 57.- World Health Organization (1969) Amoebiasis. Report of a W.H.O. Expert Committee. W.H.O. Tech. Rep. Ser., No. 421.