

11  
24

**UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.**

ESCUELA DE QUIMICA  
INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD  
NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**REACCION CRUZADA ENTRE LOS ANTIGENOS  
DE OCHO CEPAS DE AMIBAS DE PACIENTES  
CON AMIBIASIS Y DOS CEPAS DE PRIMATES  
CON PATRON ISOENZIMATICO DIFERENTE  
(ZIMODEMO)**

TESIS CON  
FALLA LE ORIGEN

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A I**

**ROCIO MARIA ANTONIETA GOMEZ VEGA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

	INDICE	PAG.
1.-	INTRODUCCION.....	1
2.-	INFORMACION GENERAL DEL TEMA.....	4
3.-	PARTE EXPERIMENTAL , METODOLOGIA Y RESULTADOS.....	6
3.1.-	Diseño del experimento.	
3.2.-	Material Biológico.	
3.2.1.-	Conejos Nueva Zelanda.	
3.2.2.-	Cepas de amibas.	
3.3.-	Cultivo monoaxénico de amibas.....	8
3.3.1.-	SIEMBRA	
3.3.2.-	CULTIVO	
3.3.3.-	SUBCULTIVO	
3.4.-	Determinación del zimodemo de las amibas median- te electroforesis horizontal. Preparación de los lisados.....	9
3.4.1.-	Determinación de la Enzima Fosfogluco- isomerasa (PGI).....	10
3.4.1.1.-	Preparación del gel de almi- dón.	
3.4.1.2.-	Corrimiento electroforético.	
3.4.1.3.-	Desarrollo de la reacción.	
3.4.2.-	Determinación de la Enzima Máfica (EM)..	12
3.4.2.1.-	Preparación del gel de almi- dón.	
3.4.2.2.-	Corrimiento electroforético.	
3.4.2.3.-	Desarrollo de la reacción.	

- 3.4.3.- Determinación de la Enzima Fosfogluco-  
mutasa (PGM)..... 13
  - 3.4.3.1.- Preparación del gel de almidón.
  - 3.4.3.2.- Corrimiento electroforético.
  - 3.4.3.3.- Desarrollo de la reacción.
- 3.4.4.- Determinación de la Enzima Hexocinasa(HK)... 14
  - 3.4.4.1.- Preparación del gel de almidón.
  - 3.4.4.2.- Corrimiento electroforético.
  - 3.4.4.3.- Desarrollo de la reacción.
- 3.5.- Inoculación a los conejos con las amibas de dife-  
rente zimodemo y demostración de la formación de  
anticuerpos mediante inmunolectroforesis.....16
  - 3.5.1.- Preparación del Inóculo.
  - 3.5.2.- Esquema de Inmunización.
  - 3.5.3.- Sangrado de los conejos.
  - 3.5.4.- Inmunolectroforesis.
    - 3.5.4.1.- Preparación de las placas de  
agarosa.
    - 3.5.4.2.- Preparación del antígeno.
- 3.6.- Aislamiento y estudio de las IgG antiamiba obte-  
nidas del suero de conejos inmunizados.....20
  - 3.6.1.- Aislamiento de las inmunoglobulinas por  
precipitación con sulfato de amonio satu-  
rado.
  - 3.6.2.- Purificación y separación de las IgG con  
DEAE Celulosa.

- 3.6.3.- Curva de calibración y determinación de proteínas por el método de Folin-Ciocalteau.
- 3.6.4.- Liofilización de las IgG.
- 3.6.5.- Reacción cruzada con el antígeno homólogo y el heterólogo de cada cepa de amiba mediante Hemaglutinación Indirecta.

3.7.- RESULTADOS..... 29

- 3.7.1.- Representación esquemática de los 18 diferentes zimodemos de E. histolytica según Sargeunt y diagrama del corrimiento electroforético de las 10 cepas de amibas estudiadas para la clasificación de su zimodemo.
- 3.7.2.- Demostración de la formación de anticuerpos por Inmunolectroforesis.
- 3.7.3.- Gráficas que representan la concentración de proteínas IgG anti-amiba obtenidas del suero de conejos inmunizados.
- 3.7.4.- Hemaglutinación Indirecta, títulos de anticuerpos y su estudio estadístico.

4.- DISCUSION ..... 47

	PAG.
5.- RESUMEN .....	53
6.- CONCLUSIONES .....	54
7.- BIBLIOGRAFIA.....	56
8.- APENDICE.....	63

8.A.- Soluciones y Reactivos.

8.B.- Equipo.

## A B R E V I A T U R A S

PGI	.....	Fosfoglucoisomerasa
EM	.....	Enzima Mállica
PGM	.....	Fosfoglucomutasa
HK	.....	Hexocinasa
F6P	.....	Fructuosa 6 fosfato
G1P	.....	Glucosa 1 fosfato
G6PD	.....	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
EDTA	.....	Acido etilen diamino tetracético
NADP	.....	Fosfato de dinucleotido nicotinamida adenina
NTT	.....	Nitrozol de tetrazolium
PMS	.....	Metasulfonato de fenazina
ATP	.....	Adenosin trifosfato
ADP	.....	Adenosin difosfato
Ab	.....	Anticuerpos
IgG	.....	Inmunoglobulina G
mg	.....	miligramos
mL	.....	mililitros

CAPITULO

## I.- INTRODUCCION:

Estudios recientes sobre la epidemiología de la amibiasis han estimado que dentro de la población mundial 500 - millones de individuos se encuentran infectados con E. histolytica ( 9 ).

Sin embargo , a pesar de ello , sólo el 10% enferman , calculándose que 40,000 individuos mueren a causa de la patología desarrollada por éste protozoario.

Para México la amibiasis constituye uno de los problemas de salud más importante , ya que se le encuentra dentro de las 10 primeras causas de muerte ( 35 ).

La patología es todavía poco comprendida pues la presencia de éste protozoario no siempre es indicativo de enfermedad , se le puede encontrar en individuos con sintomatología y sin ella ( 5 ).

En relación a la patogenicidad , se mencionan varias posibilidades tratando de revelar los mecanismos que intervienen en ella.

Unos señalan al huésped como responsable , cuando éste se encuentra inmunosuprimido ( 34 ) , así como a un mal balance nutricional ( 24 ).

Otros hacen responsable al parásito per "se" pues la liberación de sus toxinas ( 11,3, 13) y la presencia de receptores como la N-acetil glucosamina ( 11,27,28,35) son determinantes en la patogenicidad en la amibiasis invasora.

Los estudios propuestos por Sargeunt ( 33 ) se han inclinado a considerar que el parásito es el responsable de la patogenicidad, señalando diferencias entre las cepas de E. histolytica.

Estas diferencias han sido determinadas por el diferente corrimiento electroforético de 4 enzimas de la vía glicolítica.

Las enzimas mencionadas son : La Fosfoglucoisomerasa ( E.C. 5.3.1.9. ), la Fosfoglucomutasa ( E.C. 2.7.5.1. ) , la L- malatoxidorreductasa ( E.C. 1.1.1.40. ) y la Hexocinasa ( E.C. 2.7.1.1. ).

Estas diferencias en el corrimiento electroforético nos permiten distinguir entre las cepas patógenas de las que no lo son.

El objetivo de éste trabajo fué investigar si existen semejanzas o diferencias antigénicas entre las cepas de diferente zimodemo, capaces de ser mostradas por los anticuerpos de los sueros obtenidos al inmunizar animales con ellas.

Interpretandose que los antígenos de éstas son indicativos de patogenicidad, cuando el huésped responde inmunológicamente a ellos.

La hipótesis de éste trabajo fué considerar que si los anticuerpos del suero, obtenidos de animales inmunizados con amibas de diferente zimodemo ( cepas patógenas y no patógenas ) eran capaces de reconocer antígenos homólo-

gos y heterólogos esto nos indicaría semejanzas antigénicas entre cepas patógenas y las que no lo son. Esta semejanza tiene relevancia porque :

1) Nos indicaría que potencialmente las dos cepas están capacitadas para producir enfermedad , indicándonos que la patogenicidad de ellas está determinada por una relación huésped - parásito.

2) Por el contrario , si se observaran diferencias antigénicas entre las cepas patógenas y las no patógenas se argumentaría que el responsable de la patogenicidad es el protozooario per "se".

CAPITULO

II

## 2.- INFORMACION GENERAL DEL TEMA:

E. histolytica se reconoce como un organismo unicelular que pertenece al Phylum Protozoa. Por su movilidad se le incluye en la clase Rhizopoda Sarcodina (12 ).

El parásito penetra al huésped por vía oral en forma de quiste a través de agua contaminada, comida o por contacto fecal directo.(21, 27).

Su ciclo de vida consta de 5 etapas: trofozoito,prequiste, quiste y trofozoito metaquístico, todas ellas en el intestino humano (2 ).

E. histolytica es un anaerobio facultativo, con un diámetro de 25  $\mu$ , una doble membrana y un área urónica, con vesículas en su membrana externa (8,25).

Tiene un glicocalix aproximadamente de 20 a 30 nm(14 ) y los trofozoitos requieren de un pH entre 6 y 6.5 para crecer en un medio de cultivo. Se han descrito estructuras como la actina y no hay evidencia de la presencia de mitocondrias:(10, 31).

En el citoplasma se localizan una gran cantidad de enzimas en sus vacuolas lisosomales, como la fosfatasa alcalina, la malato deshidrogenasa, la aldolasa, etc (15, 16).

A E. histolytica se le puede reconocer por su tamaño, por la disposición de la cromatina en el núcleo, la presencia de cuerpos cromatóforos y todas las estructuras antes señaladas.

Sin embargo el significado de su presencia en el organismo es diferente en un huésped sin sintomatología o con patología digestiva. El criterio morfológico no basta para determi-

minar que un huésped sea capaz de desarrollar o no una amibiasis invasora. Por esto es conveniente utilizar otra metodología que permita distinguir estos diferentes tipos de amibas.

Los patrones isoenzimáticos ( zimodemos ) de E. histolytica propuestos por Sargeant ( 33 ) sugieren que unos se asocian exclusivamente con portadores asintomáticos y otros con la amibiasis invasora.

Sin embargo estudios recientes de Mirelman ( 19 ) han demostrado que el patrón isoenzimático puede modificarse, por eso es necesario un estudio que demuestre antigénicamente si existen diferencias o semejanzas entre las cepas con diferente zimodemo, considerando que el paciente responda inmunológicamente en forma diferente a la presencia de una amiba invasora de la que no lo es.

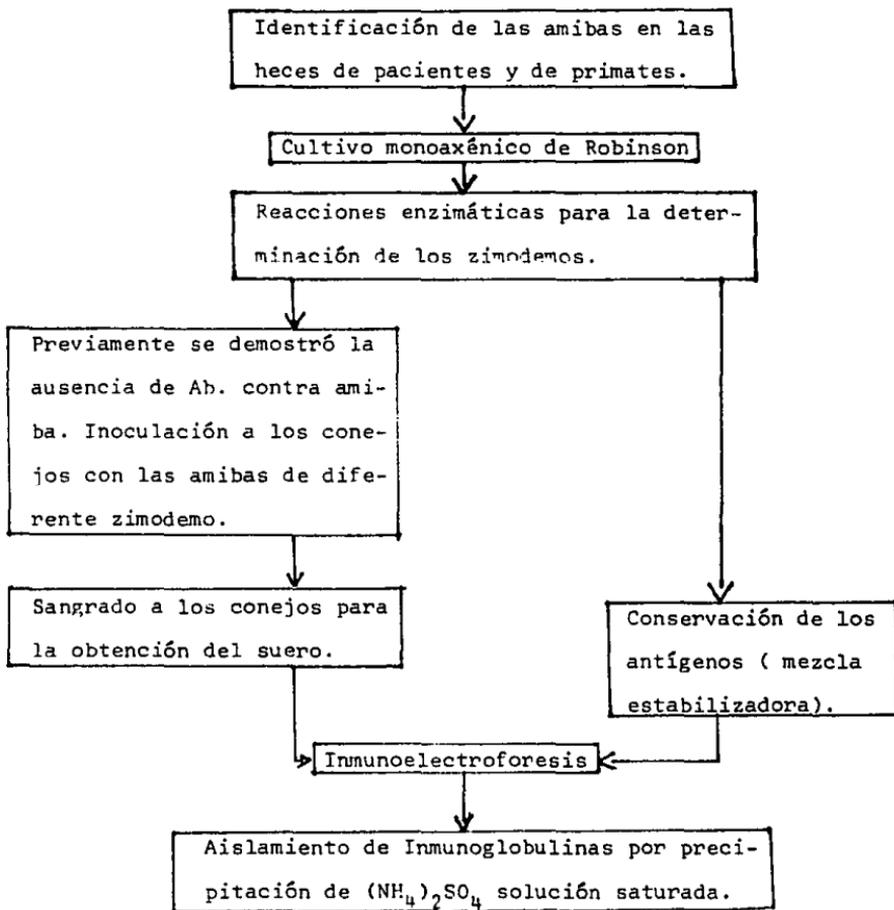
CAPITULO

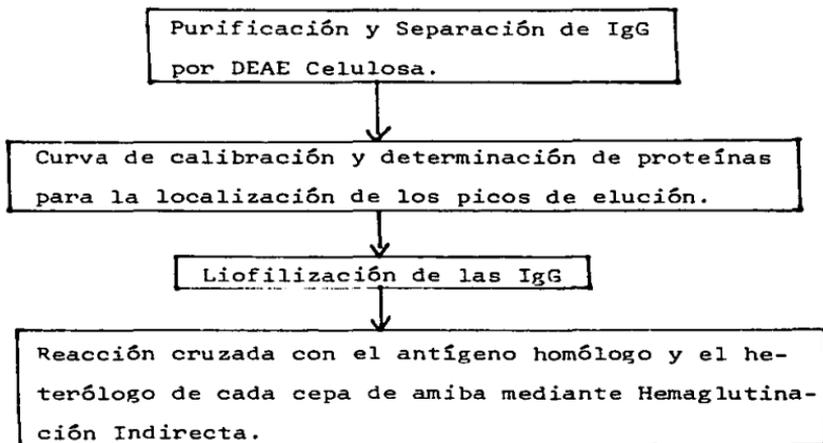
III

3.- PARTE EXPERIMENTAL , METODOLOGIA Y RESULTADOS:

3.1.- Diseño del experimento.

REACCION CRUZADA ENTRE LOS ANTIGENOS DE OCHO CEPAS DE AMIBAS DE PACIENTES CON AMIBIASIS Y DOS CEPAS DE PRIMATES CON PATRON ISOENZIMATICO DIFERENTE ( ZIMODEMO).





### 3.2.- Material Biológico .

#### 3.2.1.- Conejos Nueva Zelanda.

Se utilizaron 20 conejos Nueva Zelanda, machos, de aproximadamente 2.5 Kg de peso y de 3 meses de edad. Surtidos por el hioterio de la UNAM.

#### 3.2.2.- Cepas de amibas.

Se usaron 10 cepas de amibas, siete de ellas fueron aisladas de las heces de humanos que presentaban patología digestiva; E. histolytica HM-2;HM-14 ; HM-31; HM-32; HM-34; HM-40; HM-SN. Y una cepa más fué aislada de un absceso hepático amibiano E. histolytica HMA<sub>4</sub>. Finalmente dos cepas de E. chaetoni PM5\*

y PM5 fueron aisladas de las heces de primates de diferente zoológico. Todas las cepas fueron cultivadas monoaxénicamente por el método de Robinson (30).

### 3.3.- Cultivo monoaxénico de las amibas.

#### 3.3.1.- SIEMBRA:

Aproximadamente 50 mg de materia fecal en la que se demostró la presencia de E. histolytica por el método de Faust (7) fueron colocados en un frasco conteniendo agar salino (A.001) a éste se le adicionaron 4 gotas de eritromicina al 0.05% (A.007) así como 5 mg de almidón en polvo (A.002). Finalmente se adicionaron 2.0 mL del medio "BR" (A.009). Todo esto se dejó en la estufa a 37°C durante 24 hrs.

#### 3.3.2.- CULTIVO:

Con una pipeta pasteur se eliminó el sobrenadante dejando sólo el sedimento del frasco; a éste se le colocaron 5 mg de almidón de arroz en polvo (A.002) 2 gotas de eritromicina (A.007). Se adicionaron 2 gotas de bactopectona al 20% (A.005) y una solución de ácido phtálico (A.006) en proporciones iguales. To-

do esto se dejó incubar a 37'C durante  
24 hrs.

### 3.3.3.- SUBCULTIVO:

El subcultivo se realizó cada 48 hrs  
tomando un inóculo del sedimento del -  
cultivo y utilizando el mismo procedi-  
miento que se mencionó en el cultivo.

### 3.4.- Determinación del zimodemo de las amibas median- te electroforesis horizontal.

Preparación de los lisados: Las amibas obtenidas  
de los subcultivos fueron colocadas en un tubo  
de ensaye y centrifugadas a  $500 \times g$  a 4'C duran-  
te 15 minutos. Posteriormente se descartó el so-  
brenadante y al sedimento se le adicionó una -  
mezcla estabilizadora para enzimas elaborada con  
volumenes iguales de Ac. etilen diamino tetra -  
cético (EDTA), ac. caproico y ditioeritritol, -  
todas ellas en una concentración de 0.002 M. Se  
dejaron a - 20'C durante 24 hrs. Posteriormen-  
te se centrifugaron a  $3000 \times g$  durante 15 minu-  
tos a 4'C y con el sobrenadante se realizaron  
las determinaciones enzimáticas. Fué convenien-  
te almacenar el sobrenadante en alícuotas de -  
0.1 mL en Nitrógeno líquido a - 196'C para con-

servar la actividad enzimática.

3.4.1.- Determinación de la Enzima Fosfoglucoisomerasa ( PGI ).

3.4.1.1.- Preparación del gel de almidón:

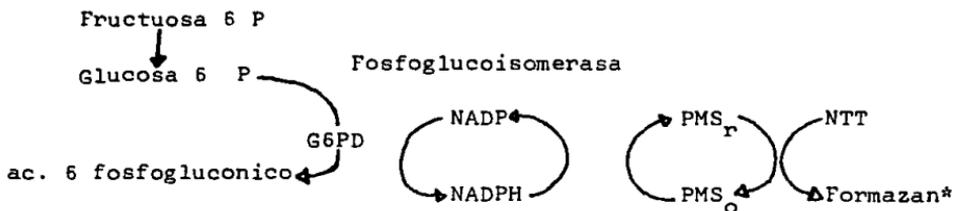
De la solución de fosfatos pH 7.0 y 0.1 M (A.012) se tomaron 12 mL y se les adiocinnaron 148 mL - de agua destilada, de ésta solución se tomaron 100 mL a los que se les agregaron de 8 a 9 g de almidón en polvo de papa ( POTATO SIGMA CHEMICAL ). Esta solución hirvió en un matraz al vacío durante 10 minutos para su desgacificación y se vertió en las placas de vidrio de 15 x 20 cm. Una vez que el almidón solidificó los sobrenadantes de las diferentes cepas de amibas se colocaron impregnados en hilos previamente lavados.

3.4.1.2.- Corrimiento electroforético:

Las placas fueron colocadas en celdas de acrílico con bases provistas de un serpentín por donde circulaba el agua proveniente de

la cámara de enfriamiento mante -  
niendo la temperatura a 8°C. El  
corrimiento tuvo una duración de  
4 horas utilizando una intensidad  
de corriente de 50 mAmperes por -  
celda y un voltaje de 120 volts.

3.4.1.3.- Desarrollo de la reacción:



\* Compuesto que da color.

Una vez transcurrido el tiempo del corrimiento electroforético se preparó una mezcla de incubación con los siguientes reactivos:

Tris :HCl	0.3 M	pH 8.0	(A.013)	7 mL
MgCl <sub>2</sub>	0.1 M		(A.014)	0.2mL
NADP	10mg/ mL		(A.015)	0.5mL
G6PD	100UI/mL		(A.016)	0.5mL
F6P	10UI/mL		(A.017)	0.2mL

NTT 5mg/mL (A.018) 1.0mL

PMS 5mg/mL (A.019) 1.0mL

Esta mezcla se vertió sobre el gel de almidón, las placas se incubaron a 37°C durante 10 minutos, - permitiendo así visualizar las bandas del corrimiento de la enzima - por la producción del formazán (compuesto de color ) el cual reveló la posición de las bandas .

### 3.4.2.- Determinación de la Enzima Málica (EM ).

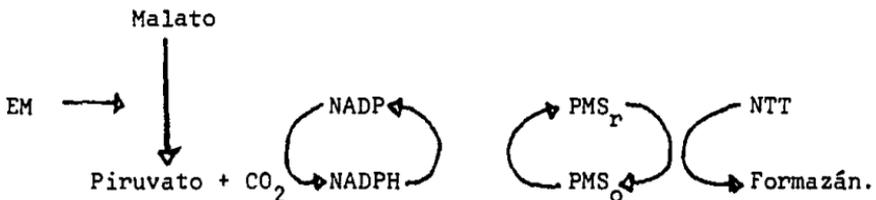
#### 3.4.2.1.- Preparación del gel de almidón.

Se preparó de acuerdo al inciso 3.4.1.1.

#### 3.4.2.2.- Corrimiento electroforético.

Descrito en el inciso 3.4.1.2.

#### 3.4.2.3.- Desarrollo de la reacción.



La mezcla de incubación se -

preparó con los siguientes reactivos :

Tris:HCl	0.3 M	pH 8.0	(A.013)7mL
MgCl <sub>2</sub>	0.1 M		(A.014)0.2ml
NADP	10mg/mL		(A.015)0.5mL
Malato	1.0 M		(A.020)1.0mL
NTT	5mg/mL		(A.018)1.0mL
PMS	5mg/mL		(A.019)1.0mL

Con ésta mezcla de incubación fué posible visualizar las bandas de corrimiento de la Enzima Mállica siguiendo el mismo procedimiento descrito para la enzima fosfoglucoisomerasa (PGI).

### 3.4.3.- Determinación de la Enzima Fosfoglucomutasa (PGM).

#### 3.4.3.1.- Preparación del gel de almidón .

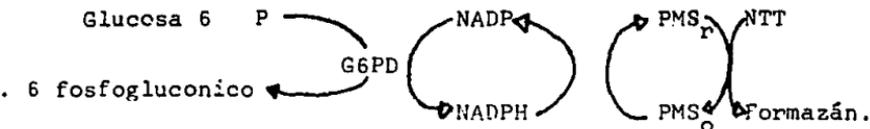
De la solución de trisma pH 7.4 (A.021) se tomaron 24 mL y se les adicionaron 136 mL de agua destilada. De ésta solución se tomaron 100 mL a los que se les agregó de 8 a 9 g de almidón en polvo de papa ( POTATO SIGMA CHEMICAL ). Esta solución fué hervida durante 10 minutos para su descalcificación virtiendose sobre la pla-

ca de vidrio. Los sobrenadantes con-  
teniendo las enzimas impregnadas en  
hilos de hilasa fueron colocados en  
las placas .

### 3.4.3.2.- Corrimiento electroforético.

Se llevó a cabo en la misma --  
forma descrita en el inciso 3.4.1.2.

### 3.4.3.3.- Desarrollo de la reacción.



La mezcla de incubación se pre-  
paró con los siguientes reactivos:

Tris:HCl	0.3 M pH 8.0 (A.013)	7 mL
MgCl <sub>2</sub>	0.1 M	(A.014)0.2mL
NADP	10mg/mL	(A.015)0.5mL
G6PD	100''I/mL	(A.016)0.1mL
G1P	12.5mg/mL	(A.022)0.1mL
NTT	5mg/mL	(A.018)1.0mL
PMS	5mg/mL	(A.019)1.0mL

El procedimiento para revelar las bandas de corrimiento de la enzima PGM fué el mismo que se siguió para las enzimas PGI y Enzima Máfica:

3.4.4.- Determinación de la Enzima Hexocinasa (HK).

3.4.4.1.- Preparación del gel de almidón.

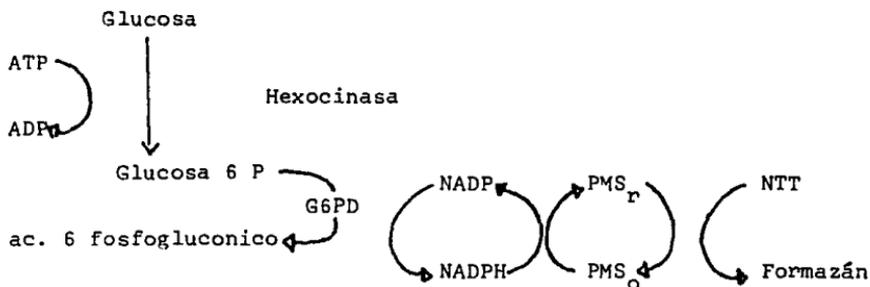
Se preparó de acuerdo al inciso

3.4.3.1.

3.4.4.2.- Corrimiento electroforético.

Descrito en el inciso 3.4.1.2.

3.4.4.3.- Desarrollo de la reacción.



La mezcla de incubación se preparó con los siguientes reactivos:

Tris:HCl 0.3 M pH 8.0 (A.013) 7 mL

MgCl<sub>2</sub> 0.1 M (A.014) 0.2 mL

NADP	10mg/mL	(A.015)0.5mL
Dextrosa	40mg/mL	(A.023)1.0mL
ATP		(A.024)1.0mL
G6PD	100UI/mL	(A.016)0.5mL
NTT	5mg/mL	(A.018)1.0mL
PMS	5mg/mL	(A.019)1.0mL

Para visualizar las bandas de corrimiento se siguió el mismo procedimiento usado para las enzimas PGI, EM y PGM.

3.5.- Inoculación a los conejos con las amibas de diferente zimodemo y demostración de la formación de anticuerpos mediante inmunolectroforesis.

3.5.1.- Preparación del Inóculo.

Las amibas cultivadas en el medio de Robinson ( 30 ) se centrifugaron a 500 x g a 4°C durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de solución salina y se les agregó 1 mL de adyuvante de Freund. Se agitó la mezcla hasta que el aspecto del aceite fué blanquecino. Se guardó en el congelador durante 24 hrs y después de éste

tiempo se inocularon los conejos.

### 3.5.2 .- Esquema de Inmunización.

Los conejos fueron pesados y marcados para después sangrarlos por punción cardíaca ( 15 mL aproximadamente ) y obtener su suero. En él se investigó la presencia de anticuepos anti*Amiba* mediante inmunolectroforesis. Se formaron 11 grupos de dos conejos cada uno a los que se les inoculó por vía intradérmica ( lomo ) 0.5 mL de cada cepa de *Amiba* preparada como se mencionó en el inciso 3.5.1 cada tercer día durante un mes. Uno de los grupos fué considerado como control.

### 3.5.3.- Sangrado de los conejos.

Después del período de inmunización se sangró a los conejos nuevamente. Aproximadamente de 20 a 25 mL de sangre por punción cardíaca . Esta fué centrifugada a 25500 x g durante 15 minutos a 15°C y se separó el suero.

### 3.5.4.- Inmunolectroforesis.

#### 3.5.4.1.- Preparación de las placas de agarosa.

Se utilizó una solución reguladora de Barbitol-Sodio, ácido barbitúrico pH 6.8 (laboratorio Helena). Los 18 g contenidos en el sobre se disolvieron en 1000 mL de agua destilada. De ésta solución se tomaron 100 mL a los que se les agregó 1 g de agarosa (SIGMA CHEMICAL) hirvió durante 15 minutos en un matraz con tapón oradado para permitir la salida del mínimo de vapor; 3 mL de ésta solución fueron colocados en portaobjetos y se esperó la solidificación. Se hicieron ranuras longitudinales hacia los lados y una oradación central.

### 3.5.4.2.- Preparación de los antígenos.

Las amibas se tomaron directamente del subcultivo de Robinson. Se centrifugaron a 155 x g a 15°C durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. Los trofozoitos de las amibas contenidos en el sedimento fueron rotos mediante cambios bruscos de temperatura ; se introdujeron primero -- en una mezcla crioscópica ( acetona y hielo seco ) y después se descongelaron con agua hirviendo. Este procedimiento se repitió 3 veces.

#### PROCEDIMIENTO:

El suero de los conejos fué colocado en las ranuras a lo largo de ellas. Estas placas se colocaron dentro de la cámara de Helena la cual ya contenía la solución reguladora de Veronal preparada -- de acuerdo al inciso 3.5.4.1. La inmunoelectroforesis se corrió durante 45 minutos con una intensidad de --- corriente de 50 mAmperes y 120 vólts.

Una vez transcurrido el tiempo de corrimiento a cada una de las placas de agarosa se les colocó en el centro el antígeno correspondiente con ayuda de un capilar. Se guardaron a baja temperatura -

(-4°C) y después de 24 a 48 horas se observaron los resultados.

3.6.- Aislamiento y estudio de las IgG anti-amiba obtenidas del suero de conejos inmunizados.

3.6.1.- Aislamiento con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solución saturada.

Una vez que se demostró la presencia de inmunoglobulinas G por la técnica de inmuno-electroforesis se procedió a trabajar con el suero de los conejos. A la cantidad en mililitros presente de cada suero se le añadió el doble de sulfato de amonio saturado (A.025) gota a gota con agitación lenta y constante. Se adicionaron 2 gotas de NaOH 0.5 N (A.026) para mantener el pH a 7.8. Se guardaron en tubos falcon y se refrigeraron durante 24 horas. Después de este período se centrifugaron a 1550 x g a 4°C durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante y al botón que se obtuvo se le añadió nuevamente un volumen igual de sulfato de amonio saturado (A.025). Este procedimiento se repitió durante 3 días. Al cuarto día se centrifugaron nuevamente a 1550 x g durante 30 minutos y al botón que

se obtuvo se le agregó un volumen igual de solución salina (A.027) y se procedió a dializar. Se utilizaron membranas para dialisis de SIGMA CHEMICAL Mo. en ellas se colocaron aproximadamente 3 mL de cada uno de los sueros de conejo, estas membranas se introdujeron en una solución de Boratos pH 8.4 (A.028). Se dejó en agitación lenta y constante a 4°C durante 2 días cambiando la solución de Boratos constantemente con el fin de eliminar los iones sulfato.

Para comprobar la eliminación de iones sulfato, se tomaron 3 mL de la solución de Boratos y se le añadió 1 mL de BaCl<sub>2</sub> (A.029) para verificar si había o no precipitación.

Una vez concluido el proceso los sueros se mantuvieron en refrigeración para posteriormente purificar las IgG por medio de cromatografía con DEAE Celulosa.

### 3.6.2.- Purificación y separación de las IgG del suero de conejos antiánfiba por cromatografía con DEAE Celulosa.

La DEAE Celulosa (A.030) se activó sur

pendiendola en un matraz kitasato de 1 litro que contenía 800 mL de HCl 0.1N (A.031). Se agitó durante 5 minutos y se dejó sedimentar durante 30 minutos. Después de ese tiempo esa suspensión se filtro con papel filtro Whatman # 1 utilizando vacío, ya filtrado el paquete de DEAE Celulosa se volvió a suspender pero ahora en 800 mL de agua destilada, se agitó durante 5 minutos y se dejó sedimentar por 30 minutos nuevamente se filtró utilizando el procedimiento ya mencionado anteriormente con el fin de lavar la DEAE Celulosa.

Una vez lavada la DEAE Celulosa se volvió a suspender en 800 mL de NaOH 0.5 N - (A.026) se agitó durante 5 minutos y se dejó sedimentar por 30 minutos , nuevamente se filtró de acuerdo al procedimiento ya descrito.

El paquete de DEAE Celulosa obtenido se continuó lavando con agua destilada ,la necesaria hasta que el líquido en el kitasato alcanzara un pH de 7.5.

Una vez alcanzado éste, se suspendió el flujo de agua y entonces el paquete de DEAE Celulosa se suspendió en una solución

de fosfatos 0.1 M pH 7.5 (A.012), se agitó 5 minutos y se esperó a que sedimentara durante 30 minutos y nuevamente se filtró 3 veces siguiendo las indicaciones ya mencionadas . Finalmente la celulosa se suspendió en la solución de fosfatos y se -- guardó en refrigeración a una temperatura de -4'C durante 24 horas.

Ya activada la DEAE Celulosa se empaquetaron con ella 20 columnas de plástico con una capacidad de 20 mL cada una de ellas. Se tuvo la precaución de colocar - un botó de fibra de vidrio para evitar la salida de la DEAE Celulosa a través de las columnas. El líquido diluyente fué la solución de fosfatos (A.012). Ya listas las 20 columnas de DEAE Celulosa , se pasaron por cada una de ellas las inmunoglobulinas precipitadas con sulfato de amonio saturado. Las fracciones proteicas - conteniendo la IgG fueron colectadas mediante un colector de fracciones Redirac LKB . La visualización de los picos de elución conteniendo las inmunoglobulinas - de la clase G ya purificadas fueron determinadas mediante la técnica de Folin-Ciocalteu ( 6 ).

3.6.3.- Curva de calibración y determinación de proteínas por el método de Folin-Ciocalteu.

La curva de calibración se elaboró por triplicado con los siguientes reactivos:

Albúmina	1mg/mL	(A.032)
NaOH	0.1 N	(A.033)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2%	(A.034)
Tartrato de Na y K		(A.035)
CuSO <sub>4</sub>	0.5 %	(A.036)
React. A		(A.037)
React. B		(A.038)

Esta curva se elaboró de acuerdo al protocolo que se describe a continuación.

n.

TUBO	SOL. ALBUMINA 1mg/mL	REACT. A	T	REACT.B
1	0 mL	2.5 mL	R	0.25 mL
2	0.1 mL	2.5 mL	E	0.25 mL
3	0.2 mL	2.5 mL	P	0.25 mL
4	0.3 mL	2.5 mL	O	0.25 mL
5	0.4 mL	2.5 mL	S	0.25 ml
6	0.5 mL	2.5 mL	O	0.25 mL
Blanco	H <sub>2</sub> O dest.	2.5 mL	10'	0.25 mL

Una vez obtenida la curva de calibración las fracciones proteicas obtenidas se protocolizaron de la siguiente forma:

MUESTRA	REACT. A	TIEMPO	REACT.B
0.5 mL	2.5 mL	10'	0.25 mL

La lectura de las proteínas se llevó a cabo en el espectrofotometro Colleman Mod 6 A a una densidad óptica de 520 nm. El resultado fué graficado y se obtuvo la concentración de proteínas.

Después de obtener las fracciones de IgG las columnas de DEAE Celulosa se eluyeron para verificar la presencia o ausencia de IgM por el siguiente método.

Se hizo pasar a través de las columnas 10 mL de glicina 0.2 M pH 2.8 (A.039) 10 mL de glicina 0.2 M pH 2.2(A.040) y 10 mL de  $K_2HPO_4$  1 M (A.041 ) y las fracciones que se obtuvieron se leyeron de la misma manera que las fracciones de IgG.

#### 3.6.4.- Liofilización de las IgG.

Las fracciones proteicas fueron con-

geladas con una mezcla crioscópica ( acetona y hielo seco ) y se colocaron en el liofilizador Labconco durante 12 horas - hasta su liofilización.

3.6.5.- Reacción cruzada con el antígeno homólogo y el heterólogo de cada cepa de amiba mediante Hemaglutinación Indirecta (22).

Una vez que transcurrieron los 10 días de maduración de los glóbulos rojos de carnero conteniendo un volumen igual de solución de Alsever (A.042 y A. 043) , se centrifugaron a 2000 x g durante 5 minutos, el paquete de glóbulos obtenido se lavó 3 veces con solución salina. Después del último lavado a ese mismo paquete se le añadieron aproximadamente 10 mL de suero normal de conejo inactivado (A.047). Se mantuvieron a una temperatura de 37°C durante 1 hora refrigerándose después toda la noche a 4°C.

A las 24 horas nuevamente se centrifugaron a 2000 x g durante 15 minutos guardando el sobrenadante para hacer diluciones. El paquete de glóbulos rojos de carnero obtenidos se suspendió en 3 mL de solución reguladora de fosfatos salinos pH 7.2 (A.045)- así como 3 mL de ácido tánico diluido 1:20,000 (A.044). Esta suspensión se incubó a 37°C

durante 10 minutos eliminandose el sobrenadante y nuevamente el paquete de glóbulos rojos ya tanizados se les agregó 3 mL de la solución de fosfatos salinos pH 6.4 (A.046). El suero que se guardó para hacer diluciones también se diluyó 1:100 con solución salina.

Preparación del antígeno: En un tubo de ensaye se colocaron 1 mL de antígeno correspondiente a la cepa de amiba inoculada a cada conejo , se les agregó además 1 mL de la solución de fosfatos salinos pH 6.4 (A.046) así como 1 mL de glóbulos rojos tanizados.

La Hemaglutinación Indirecta con el antígeno homólogo y el heterólogo se llevó a cabo de la siguiente manera.

Primero se hizo reaccionar el suero de cada uno de los conejos inoculados conteniendo la inmunoglobulina completa, es decir, sin purificar y sin separar con cada una de las cepas de amibas trabajadas, colocando en cada uno de los pozos de la placa de hemaglutinación 0.1 mL de suero normal de conejo - diluído 1 : 100 con solución salina; 0.1 mL de suero de conejo inoculado y finalmente 20 microlitros de glóbulos rojos de carbero tanizados conteniendo el antígeno.

Después de 12 horas se realizaron las lecturas, cada lectura correspondió a una dilución de acuerdo a la siguiente tabla:

1 = 1:2	7 = 1:128
2 = 1:4	8 = 1:256
3 = 1:8	9 = 1:512
4 = 1:16	10 = 1:1024
5 = 1:32	11 = 1:2048
6 = 1:64	12 = 1:4096

Posteriormente se llevó a cabo la Hemaglutinación Indirecta con el antígeno homólogo y el heterólogo haciendo reaccionar el suero de los conejos conteniendo la IgG ya purificada. El procedimiento de la lectura se realizó de acuerdo a la tabla de diluciones ya descrita.

3.7.- RESULTADOS:

3.7.1.- Representación esquemática de los 18 diferentes zimodemos de E. histolytica según Sargeaunt ( 33 ) y diagrama del corrimiento electroforético de las 10 cepas de amibas estudiadas para la clasificación de su zimodemo.

Mediante el análisis coproparasitoscópico se demostró que las 10 cepas presentaron el cultivo monoaxénico para amibas positivo después de 24 horas. La interpretación del corrimiento isoenzimático ( zimodemo ) de éstas amibas, se llevó a cabo siguiendo la clasificación establecida por Sargeaunt y ésta se muestra en la Fig. 1.

FIG. 7 ZIMODEMOS DE ENTAMOEBA HISTOLYTICA

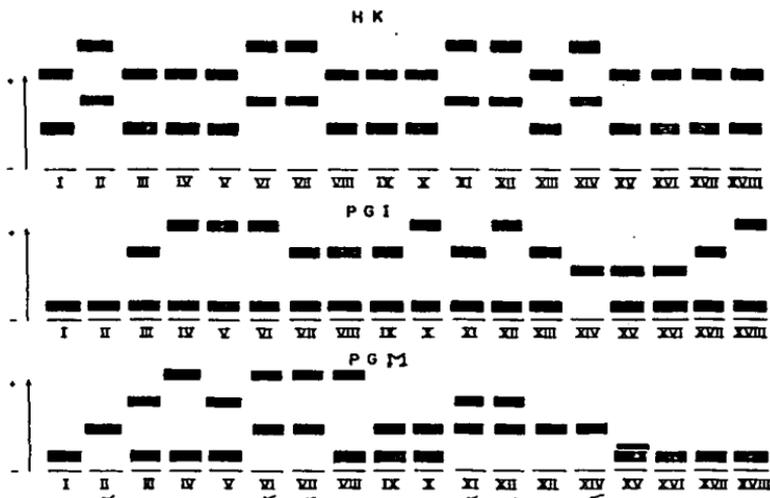


Fig.1.- Esquema que incluye a los zimodemos II, VI, VII, XI, XII y XIV considerados por Sargeaunt como zimodemos patógenos.

El corrimiento electroforético de las enzimas Málica y PGI obtenidas de los hidrolizados de lasamibas en las placas de gel de almidón se muestran en las fig. 2 y 3 - respectivamente.

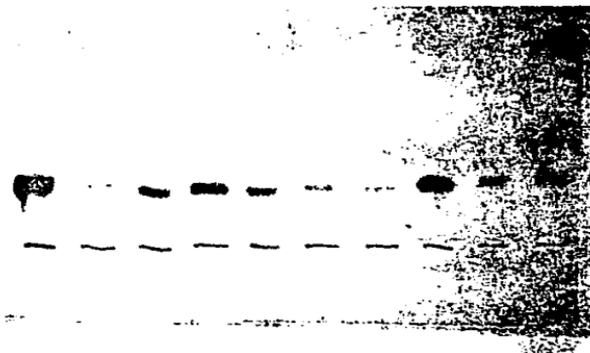


fig. 2.- Corrimiento electroforético de la Enzima Málica obtenida de los cultivos de los cultivos de E. histolytica HMC HM 34;HM 14;HM 2;HM 40;HM 32;HM 31;PMS5 PMS\* y HMA<sub>4</sub> respectivamente.

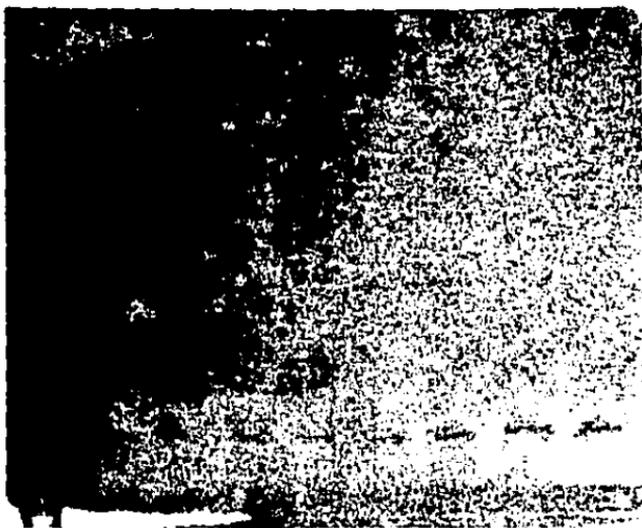


Fig.3.- Corrimiento electroforético de la Enzima PGI obtenida de los cultivos de E. histolytica HMC; HM34;HM 14;HM 2;HM 40;HM 32; HM 31;PM5 ;PM5\* y HMA<sub>4</sub> respectivamente.

La posición de las bandas que representan los grupos isoenzimáticos ( zîmodemos ) obtenidos al utilizar las 4 enzimas se presenta en la Fig. 4.

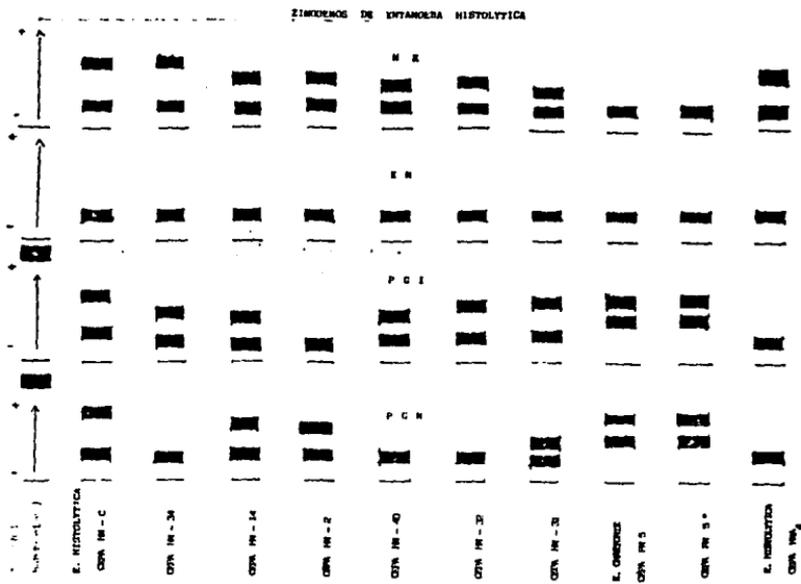


Fig.4.- Diagrama del corrimiento electroforético de las enzimas PGI, PGM, EM y HK obtenidas de los cultivos de *E. histolytica* HMC;HM 34;HM 14;HM 2;HM 40;HM 32;HM 31;PM5; PM5\* y HMA<sub>4</sub> respectivamente.

La tabla I representa una breve historia clínica de los pacientes, así como la clasificación del zimodemo de las amibas por la metodología antes mencionada.

CEPA	HISTORIA CLINICA	ZIMODEMO
HM 2	Dolor abdominal Diarrea Moco	I
HMA <sub>6</sub>	Absceso hepático amibiano	II
HM 14	Dolor abdominal Diarrea Moco	IV
HM 5	Dolor abdominal Diarrea Moco	IV
HM 31	Dolor abdominal Diarrea Moco	IX
HM 32	Dolor abdominal Diarrea Moco	XIII
HM 34	Dolor abdominal Diarrea Moco	XIII
HM 40	Dolor abdominal Diarrea Moco	XIII
PM 5 <sup>a</sup>	Diarrea Moco	E. chaetoni
PM 5	Diarrea Moco	E. chaetoni

Tabla I

3.7.2.- Demostración de la formación de anticuerpos por  
Inmunolectroforesis.

La inmunización de los conejos con las 10 cepas de amibas dió como resultado la formación de anticuerpos en el suero anticepa inoculada, estos fueron demostrados fácilmente por Inmunolectroforesis como se muestra en la Fig. 5.

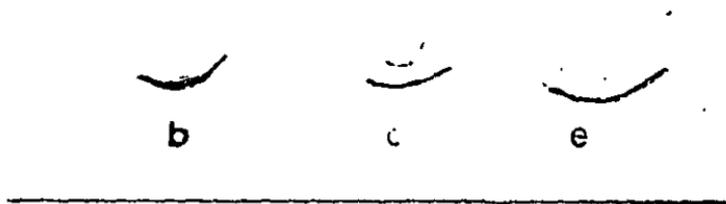
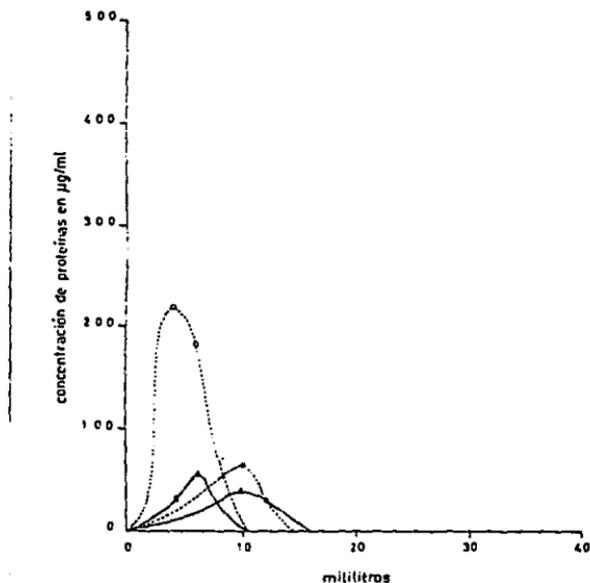


Fig. 5.- Inmunolectroforesis del suero de conejos i-  
noculados con las cepas; b) E. histolytica  
HM 2; c) E. histolytica HM 32; d) E. chaetoni  
PM 5.

3.7.3.- Gráficas que representan la concentración de proteínas IgG antiamiba obtenidas del suero de conejos inmunizados.

La separación y purificación de las IgG obtenidas del suero de conejos inmunizados con la cepa HMA<sub>4</sub> primero por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y después a través de una columna de DEAE Celulosa dió como resultado el obtenido en la Fig. 6.

Fig. 6



Purificación de una IgG anti-AMIBA de conejos por la Celulosa DEAE

La purificación de la Inmunoglobulina G obtenida del suero de conejo inmunizado con la cepa L. chaetoni PM 5\* fué diferente como se muestra en la Fig. 7.

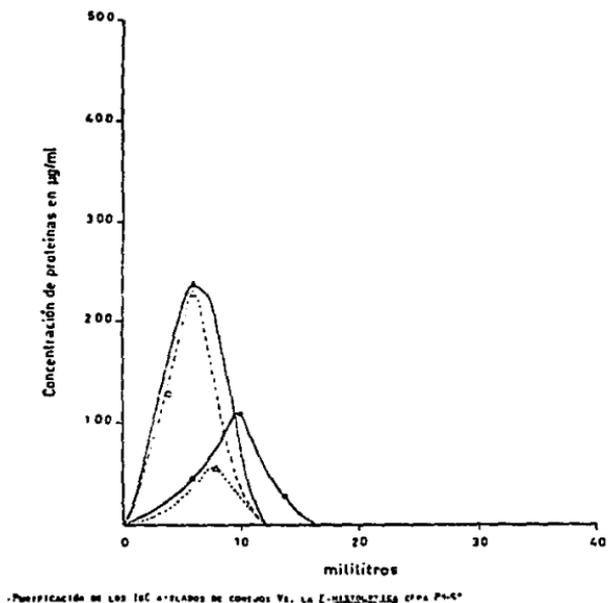
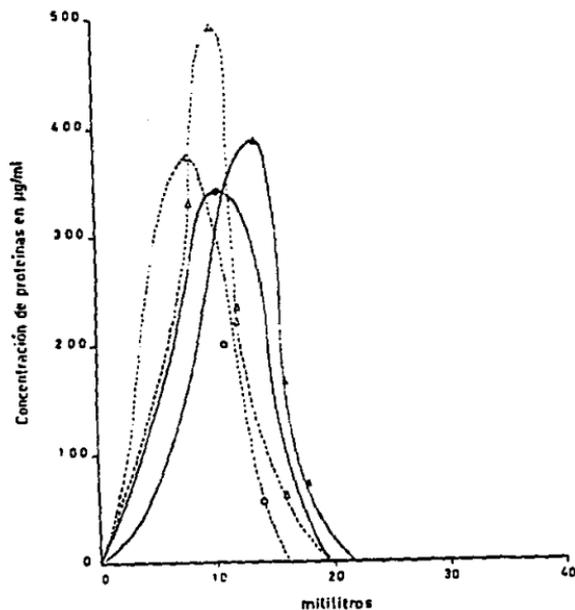


Fig. 7

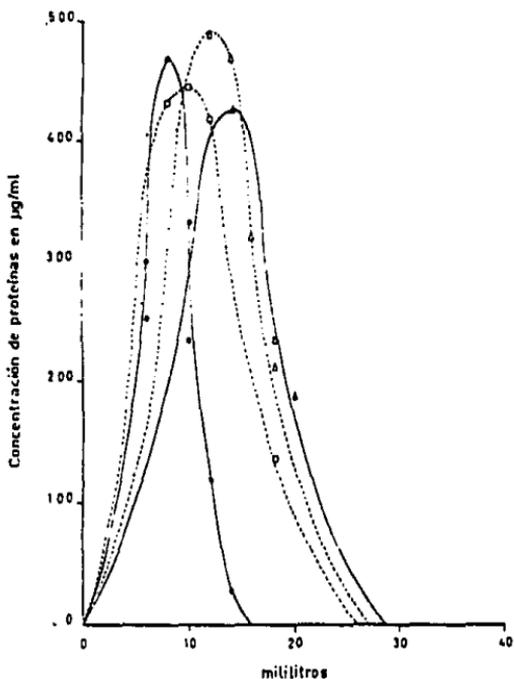
Así mismo siguiendo igual metodología la figura 8 presenta los resultados obtenidos al purificar las IgG aisladas del suero de conejo inmunizado con la cepa E. chaetoni PM 5.



Purificación de las IgG aisladas de conejos Va. la E. chaetoni cepa PM-5

Fig. 8

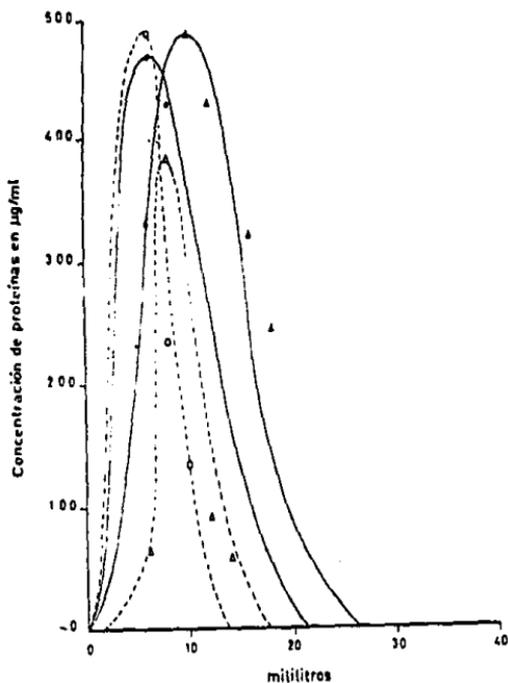
La figura 9 muestra los resultados obtenidos de la purificación de las IgG cuando se inmunizó al conejo con la cepa de E. histolytica HM 31.



PURIFICACIÓN DE LOS IgG AISLADOS DE CONEJOS VS. LA E. HISTOLYTICA CEPA HM-31

Fig. 9

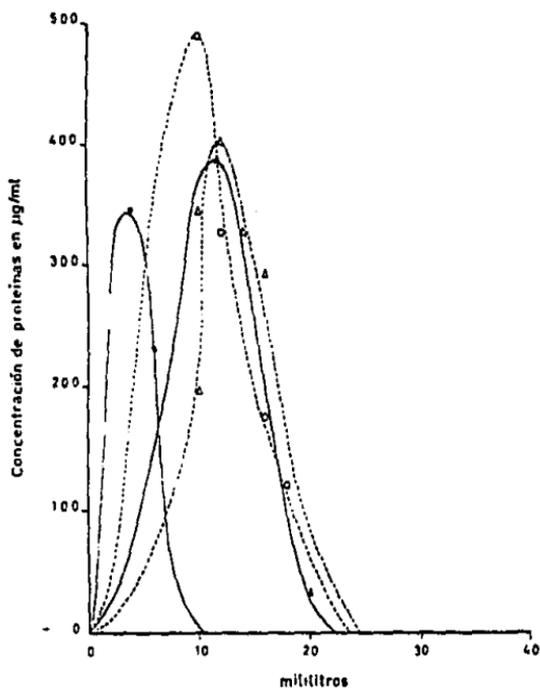
Con igual objetivo la figura 10 muestra los resultados obtenidos cuando fué utilizado el suero de los conejos inmunizados con la cepa de E. histolytica HM 37.



PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUEROS DE CONEJOS VS. LA ESPIROCHETA CEPA HM-37

Fig. 10

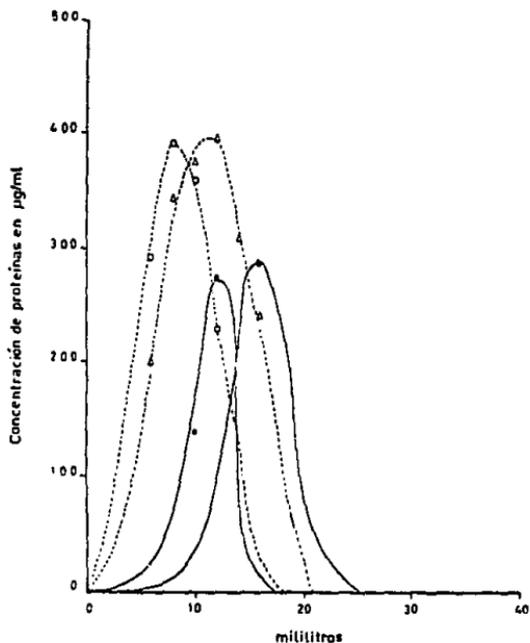
La figura 11 presenta la separación de las IgG presentes en el suero de los conejos inmunizados con la cepa E. histolytica HM 40.



PURIFICACIÓN DE LAS IgG AISLADAS DE CONEJOS VS. LA CEPA HM 40

Fig. 11

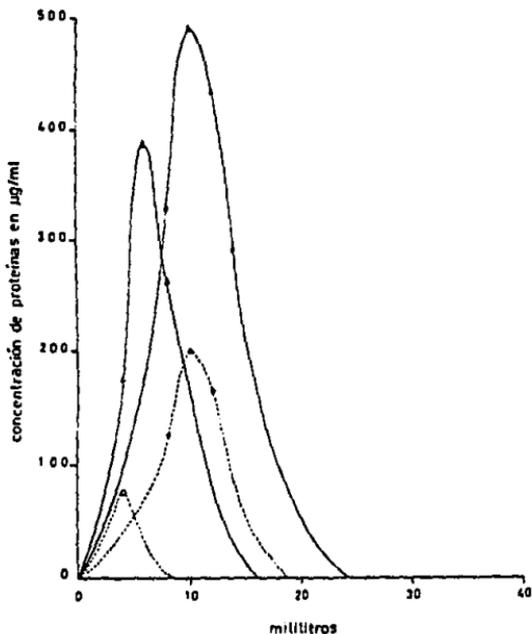
El aislamiento de las IgG del suero de los conejos inmunizados con la cepa E. histolytica HM 2 se muestra en la figura 12.



PURIFICACIÓN DE LOS IgG AISLADOS DE CONEJOS VS. LA E. HISTOLYTICA CEPA HM-2

Fig. 12

Así mismo al emplear el suero de los conejos inmunizados con la cepa de E. histolytica HM 14 la separación de IgG se muestra en la figura 13.



Publicación de los INS. ASESOR DE COLAB. P. LA (L. 1975, 1976) DE M. 14 /

Fig. 13

En forma similar se muestran los resultados obtenidos en la figura 14 cuando se inmunizaron a los conejos con la cepa de E. histolytica HM 34.

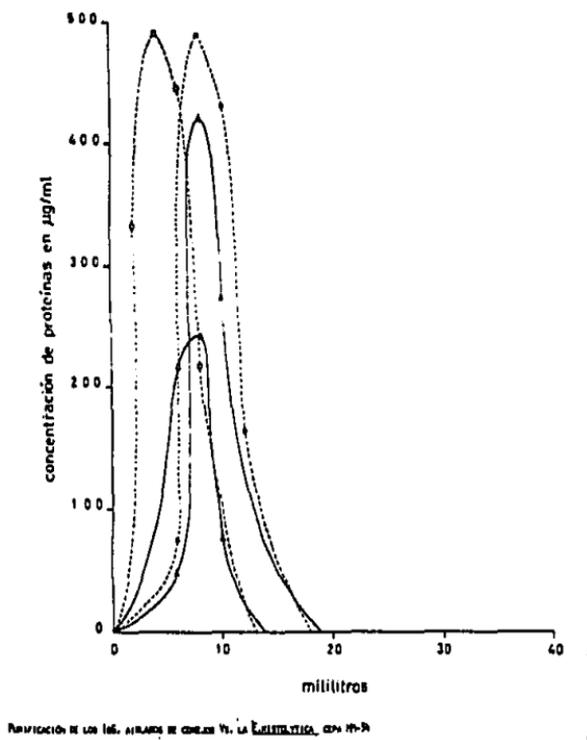
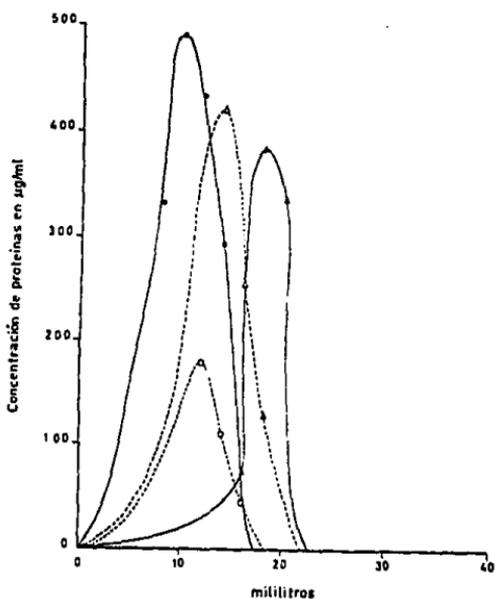


Fig. 14

Finalmente la figura 15 muestra de acuerdo a la metodología ya señalada, la purificación de las IgG del suero de los conejos inmunizados con la cepa de E. histolytica HM C.



PURIFICACIÓN DE LAS IgG AISLADAS DE CONEJOS VS. LA E. HISTOLYTICA CEPA HM-C

Fig. 15

3.7.4.- Hengalutinación Indirecta, títulos de anticuerpos y su estudio estadístico.

ZIMODEMO	ANTIGENO AMIBIANO	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	INDICE TITULO PROMEDIO	MEDIA GEOMETRICA
		( 1 )	( 2 )	( 3 )	( 4 )	( 5 )	( 6 )	( 7 )		
I	HM 2	-	5	9	2	1	-	-	2.2+0.68	1:75.86+1.73.
II	HMA <sub>6</sub>	1	7	4	3	1	-	2	3.1+1.77	1:96.83+3.5
IV	HM C	3	4	5	2	3	-	-	2.7+1.30	1:72+2.57
IV	HM 14	1	4	6	4	2	-	-	3.4+1.11	1:85.1+2.13
IX	HM 31	2	2	8	6	-	-	-	2.7+ <u>.82</u>	1:79.4+1.95
XIII	HM 32	3	7	8	-	-	-	-	2.1+ <u>.78</u>	1:47.8+1.66*
XIII	HM 34	1	2	3	2	3	-	1	2.8+1.4	1:134.3+3.63
XIII	HM 40	5	5	6	2	1	-	-	1.89+ <u>.8</u>	1:52.4+2.23
E. chatoni.	PM 5*	1	5	8	2	3	-	-	2.9+ <u>.17</u>	1:82.7+2.38
E. chatoni.	PM 5	3	4	6	3	1	-	-	2.4+ <u>.17</u>	1:64+2.18

\* p < 0.020

TARLA II

ZIMODEMO	Aq.	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	INDICE	X Geométrica Tit. de Ancs.
		( 1 )	( 2 )	( 3 )	( 4 )	( 5 )		
I	HM 2	-	-	2	-	-	3.0± 0	1:80.04±0.00
	HM 2	-	-	-	-	-	-	-
II	HMA <sub>4</sub>	-	-	1-	-	-	3.5±0.5	1:113.2±3.20
	HMA <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-
IV	HM 14	2	-	2	-	-	2.0±1.15	1:40.0± 2.22
	HM 14	-	-	-	-	-	-	-
	HM C	-	2	2	-	-	2.5± 0.33	1:56.5±1.49
	HM C	-	-	-	-	-	-	-
IX	HM 31	-	-	1	1	-	2.5±5.70	1: 113.2±4.38
	HM 31	-	-	-	-	-	-	-
	HM 32	1	3	2	-	-	2.16±0.75	1:45.00±1.60
	HM 32	-	-	-	-	-	-	-
XIII	HM 34	1	2	3	-	-	2.33±0.81	1:48.56±3.60
	HM 34	-	-	-	-	-	-	-
	HM 40	2	2	2	-	-	2.00±0.89	1:39.9±2.20
	HM 40	-	-	-	-	-	-	-
E. chatoni.	PM 5#	2	2	-	-	-	1.5±0.57	1:28.10±2.30
	PM 5#	-	-	-	-	-	-	-
E. chatoni	PM 5	1	2	1	-	-	2.0±0.81	1:40± 2.10
	PM 5	-	-	-	-	-	-	-

TABLA III

CAPITULO

IV

#### 4.- DISCUSION:

Desde 1970 los estudios de Przemyslaw ( 26 ) señalaron diferencias antigénicas importantes entre cepas de amibas. En aquella ocasión mediante reacciones cruzadas con sueros homólogos y heterólogos, comparando a los antígenos de E. histolytica aislada de pacientes con patología digestiva y sin ella. Asumiendo que el diferente comportamiento de estos protozoarios frente al huésped era una respuesta a los distintos antígenos de las amibas, responsabilizandolos así de la virulencia de ella.

Sin embargo se ha demostrado que en el suero de pacientes con amibiasis invasora la reacción cruzada que se presenta con los antígenos amibianos, probablemente se debe a que se encuentran parasitados con más de una cepa de amibas de diferente espectro antigénico.

El patrón isoenzimático es un parámetro que se ha utilizado con diferentes fines. Uno de ellos como diagnóstico (4) para determinar alteraciones metabólicas. Fué por ello que pensamos que éste podría darnos una información importante .

La tabla I muestra que las siete cepas de E. histolytica fueron aisladas de pacientes con patología digestiva y el resultado obtenido al determinar el zimodemo de las amibas, mostró que todas correspondieron a amibas clasificadas por Sargeant ( 32, 33 ) como no patógenas.

Excepto la cepa HMA<sub>4</sub> que correspondió al zimodemo II la cual fué aislada de un paciente con absceso hepático amibiano.

La explicación que dimos a estos resultados fué que la virulencia en las amibas no puede justificarse exclusivamente por su patrón isoenzimático ya que éste se define por las enzimas de la vía glicolítica. Sin embargo debemos recordar que la participación de carbohidratos ( 27, 28 ) y sus vías metabólicas es determinante para definir a una amiba invasora de la que no lo es.

Debemos mencionar que la inmunización se llevó a cabo por duplicado con el objeto de determinar si la diferente respuesta de los animales dependía de la capacidad inmunológica de estos, o bien los responsables eran los antígenos de cada cepa de amibas.

La inmunización con los antígenos de estas 10 cepas de amibas, en los conejos dió como resultado la formación de anticuerpos . Estas inmunoglobulinas específicas anti amibianas fueron mostradas mediante inmunoelectroforesis . como se mostró en la Fig. 5. Y la separación y purificación de estas inmunoglobulinas fué presentada en las gráficas demostrándose claramente una diferente capacidad de estos antígenos para producir anticuerpos.

Nuestro interés consistió en determinar que tan importante era la reacción cruzada que se presentaba entre los

antígenos de cada una de las cepas de amibas y las IgG aisladas de los sueros heterólogos obtenidos de inmunizar a los animales con las cepas de amibas restantes. Esto nos daría una información en relación a que tan compartidos estaban los determinantes antigénicos entre las 10 cepas de amibas. Al tratar estadísticamente el título de anticuerpos obtenidos de estos resultados mediante un analisis de varianza fué significativo  $F = 1.5080$   $p = < 0.05$ .

El analisis individual nos mostró que los antígenos de la cepa de E. histolytica HMA<sub>4</sub> zimodemo II aislada de un paciente con absceso hepático amibiano y considerada como una amiba invasora, se comportó en la misma forma que las cepas de E. histolytica HM 31; HM 2; HM 34; HM 14; y E. chaetoni PM5\* al no mostrar diferencias estadísticamente significativas en los títulos de anticuerpos entre ellas.

Coincidiendo todas en diferenciarse con los antígenos de la cepa E. histolytica HM 32 que dió con los sueros heterólogos títulos de anticuerpos diferentes estadísticamente significativos  $p = < 0.05$ . Por lo que inferimos que ésta cepa tiene antígenos menos compartidos con las cepas antes mencionadas como se muestra en la tabla II.

Por otro lado los antígenos de E. histolytica cepa - HM 34 presentaron un comportamiento diferente puesto que sus antígenos con los sueros heterólogos no sólo reaccionaron en forma diferente a los de la cepa E. histolytica Hm 32 como ya mencionamos. Sino que también lo hicieron con respecto a

los antígenos de la cepa E. histolytica HM 40 al presentar títulos de anticuerpos distintos con los sueros heterólogos dando una diferencia estadísticamente significativa de una  $p < 0.020$ .

La interpretación que dimos a estos resultados fué que probablemente los antígenos de E. histolytica cepa HM 34 poseen semejanzas parciales con los de las cepas de E. histolytica HMA<sub>4</sub>; HM 31; HM 32; HM 14 y E. chaetoni PM 5 que permitieron diferenciarse de los antígenos de la cepa E. histolytica HM 40 lo cual nos indicó diferencias antigénicas específicas en ésta cepa.

Siguiendo éste criterio de semejanzas antigénicas los antígenos de E. histolytica cepa HM C y E. chaetoni PM 5 no mostraron diferencias estadísticamente significativas con los títulos de anticuerpos de los sueros heterólogos. Lo cual interpretamos como similitud antigénica entre estas 2 cepas a pesar de haberse aislado de un diferente huésped.

Esto tiene relevancia por la posibilidad de obtener un antígeno común con fines de utilizarlo en una vacuna lo cual nos daría hipotéticamente una protección inmunológica importante.

Reafirmando ésta postura los resultados obtenidos al determinar el título de anticuerpos utilizando los antígenos de las cepas de amibas con igual zimodemo y los sueros obtenidos de inmunizar con estas cepas ( tabla 3). Los títulos de anticuerpos con los sueros homólogos ( igual zimo

demos aunque distinta cepa de amibas ) no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Por lo que suponemos que los anticuerpos fueron capaces de reconocer a los antígenos de una amiba con igual zimodemo. Esto fué el caso del zimodemo XIII con las cepas de E. histolytica HM 32; HM 34 y HM 40. Debemos recordar que estas cepas al ponerse en presencia de sueros heterólogos fueron los que se diferenciaron en forma importante entre ellas. Sin embargo al reaccionar con los sueros homólogos no lo hicieron.

La interpretación que dimos a estos resultados fué que probablemente tiene entre ellas determinantes antigénicas comunes en forma más importante pero también están presentes los determinantes antigénicos específicos que se pusieron de manifiesto con los sueros heterólogos al observarse diferencias estadísticamente significativas.

De igual manera las cepas zimodemo IV de E. histolytica HM14 y HM C y las de primates E. chaetoni PM 5\* y PM 5 no presentaron diferencias estadísticamente significativas con los sueros homólogos.

No así cuando se utilizaron antígenos de diferente zimodemo como es el caso de la cepa E. histolytica HM 2 zimodemo I y E. histolytica HM 14 zimodemo IV y los sueros heterólogos en donde los títulos de anticuerpos presentaron diferencias estadísticamente significativas  $p < 0.05$ .

Por lo que concluimos que el zimodemo de una amiba en ocasiones nos ayuda indicandonos en forma parcial a los constituyentes antigénicos , lo cual nos hablaría de las ventajas que representa conocer el zimodemo de las amibas con las limitaciones antes mencionadas.

Aunque se ha demostrado en otros protozoarios ( 20 ) que las diferencias antigénicas se encuentran codificadas genéticamente, aparentemente en las cepas de E. histolytica, esto no sucedió.

Por otro lado los estudios de Osisanya ( 23 ) comparados a los nuestros, mostraron claramente que los anticuerpos obtenidos de una persona que hospeda una amiba con diferente zimodemo probablemente no fueron capaces de diferenciar amibas con diferente zimodemo probablemente ésta pérdida de especificidad fué porque su intestino estaba colonizado por amibas de diferente zimodemo.

El avance que tuvimos nosotros sobre éste trabajo fué que utilizamos clonas de amibas de un zimodemo determinado para inmunizar a los animales y el trabajo de Osisanya utilizó el suero de pacientes que como ya mencionamos más de una cepa de amibas pudieron estar presentes. Por lo que consideramos que nuestro estudio es más definido.

CAPITULO

V

5.- RESUMEN :

- 1.- Se aislaron E. histolytica de las heces de siete pacientes con colitis amibiana, una de un absceso hepático amibiano y dos de primates.
- 2.- Se llevó a cabo el cultivo de E. histolytica en las heces y el líquido purulento de estos pacientes así como de los primates por el método de Robinson.
- 3.- De cada una de las 10 cepas de amibas se inocularon dos conejos.
- 4.- Se demostró la presencia de inmunoglobulinas en el suero de los conejos por inmunolectroforesis contra los antígenos inoculados.
- 5.- Se purificaron las inmunoglobulinas utilizando sulfato de amonio y una columna de DEAE Celulosa.
- 6.- Se practicaron reacciones de hemaglutinación indirecta con los sueros homólogos y heterólogos.
- 7.- Los resultados mostraron que se presentó una reacción cruzada importante mediante la Hemaglutinación Indirecta en donde con la cepa homóloga -  
fué la reacción más significativa.

CAPITULO

VI

## 6.- CONCLUSIONES :

De acuerdo a la hipótesis que postulamos en éste trabajo los resultados obtenidos mostraron claramente que hubo semejanzas antigénicas entre algunas de las cepas de amibas.

Sin embargo otras tuvieron un comportamiento diferente infiriendo en ellos diferencias antigénicas importantes a pesar de que fueron aisladas de pacientes con patología digestiva.

Por otro lado pensamos que el zimodemo de las amibas no reveló el nivel de invasibilidad del protozoario, pues como ya ya se mencionó para determinar éste, intervienen las enzimas de la vía glicolítica , y esto no representa niveles de patogenicidad.

Aunque como ya mencionamos el metabolismo de carbohidratos es determinante en una amiba invasora de la que no -o es por la presencia de receptores de la N- acetil glucosamina.

Las semejanzas y diferencias antigénicas encontradas por nosotros entre las cepas de amibas estudiadas, reveló que la cepa E. histolytica HMA<sub>4</sub> obtenida de un absceso hepático amibiano y las cepas de E. histolytica HM 31;HM 2; HM 34; HM 14 así como una cepa de primates E. chaetoni PM5\* desde el punto de vista antigénico, potencialmente estan capacitadas para desarrollar un absceso hepático amibiano.

Sin embargo la cepa de E. histolytica HM 32 presentó diferencias antigénicas importantes con respecto a todas

las demás y también fué aislada de un paciente con patología digestiva.

Por otro lado dos de las cepas de E. histolytica HM C y E. chaetoni PM 5 presentaron antígenos comunes con todas.

De acuerdo a estos resultados concluimos que en el aspecto estudiado por nosotros, el responsable del diferente comportamiento de E. histolytica fué el protozooario per "se" aunque no debemos olvidar que el huésped probablemente influye también en forma importante.

CAPITULO

VII

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Ali, K.Z., Meerovitch, E., A comparative study of the antigens of some of the " histolytica - type" strains of Entamoeba; A qualitative and quantitative evaluation of antigens by Indirect Hemagglutination, Gel- Precipitation and Immunoelectrophoresis.  
The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 17 (4): 528 - 539, ( 1986 ).
- 2.- Barker, D.C., Swales, L.S., Characteristics of ribosomes during differentiation from trophozoite to cyst in axenic Entamoeba sp. Cell Differ; 1: 297 -306, - ( 1972 ).
- 3.- Bas, H.J., Entamoeba histolytica:cytopathogenicity of intact amoeba and cell free extracts:Isolate and characterization of an intracellular toxin.  
Exp. Parasitol; 47: 369 - 72, ( 1979 ).
- 4.- Batandier, C., Isoenzyme Pattern of Enolase in the diagnosis of Neuroendocrine Bronchopulmonary tumors.  
Cancer 60 : 838 - 843, ( 1979 ).
- 5.- Becerra, E., Minvielle, L., Colorado, F., Consideraciones sobre mil casos de enfermos con amibiasis intestinal. Rev. Invest. Clin; 4: 193 - 201, ( 1952 ).

- 6.- Dawson, R.M.C., Data for Biochemical Research.619,  
( 1964 ).
- 7.- Faust and Rusell ., Craing and Faust's. Clinical  
Parasitology. Lea and Tebiger Philadelphia, (1964).
- 8.- Fletcher,K.A., Maegraith,B.G., Jaramilinta,R.,  
Electronmicrope studies of trophozoites of Entamoeba  
histolytica .Ann.Trop.Med.Parasitol;56: 496-9,(1962).
- 9.- Guerrant,R.L., The global problem of amebiasis:  
Current status, Research needs, and opportunities  
for the progress Reviews of Infections Diseases:8  
( 2 ): 218 -27,( 1986).
- 10.- Kettis,A.A., Lidman;K., Fragraeus,A., Actin in  
Entamoeba histolytica trophozoites revealed by  
human antibodies.  
J.Parasitol; 63: 581 -3 , ( 1977 ).
- 11.- Kobilier,D., Mirelman,D., Adhesion of Entamoeba  
histolytica trophozoites to monolayers of human  
cells. J. Infect.Dis; 144 : 539 - 546, ( 1981 ).
- 12.- Levine,N.D., Corliss, J.O., Cox FEG., Deroux,G.,  
Grain,J., Homigberg,B.M., Leedale,A.R., Lam,J.,  
Lynn, D., Merinfeld,E.G., Page, P.C., Poljansky,  
G., Spragre,V., Vauro,J., Wallace,F.G., A newly

- revised classification of the protozoa. *J. Protozool.*;  
27: 37 - 58, ( 1980 ).
- 13.- Lushbaugh, W.B., Karialla, A.B., Cantey, J.R., Hofbauer, A.F., Pittman, F.E., Isolation of a cytotoxin -entero toxin from *Entamoeba histolytica*.  
*J. Infect. Dis.*; 139 ( 1): 9 - 17, ( 1979 ).
- 14.- Lushbaugh, W.B., Miller, J.H., Fine structural topoche mistry of *Entamoeba histolytica*. Schawdinn, 1903. *J. Parasitol.*; 60 : 421 - 33, ( 1974 ).
- 15.- Martínez - Palomo, A., González - Robles, A., De la Torre, M., De la hoz, R., Fijación e inclusión in situ de *Entamoeba histolytica*; Aplicaciones en estudios de morfología y citoquímica ultramicroscopica. *Arch. Invest. Med. (Méx)*. 5 ( 2 ): 283 -92, ( 1974 ).
- 16.- Martínez - Palomo, A., The biology of *Entamoeba histolytica* : Reserch studies press, John Wiley and sons, ( 1982 ).
- 17.- Mathews, H.H, Moss, D.M., Healy, G.R., Milvan, D., Isoenzyme analysis of *Entamoeba histolytica* Isolate - from homosexual Men. *Journal of Infections Diseases*; 153 ( 4 ): 793 - 795, ( 1986 ).
- 18.- Ishace, M.C., Padma. , Antigenic variation among strains of *Entamoeba histolytica* . *Annals of Tropi-*

cal Medicine and Parasitology; 74 ( 3 ):373-375,  
( 1980 ).

- 19.- Mirelman,D., Eracha,R., Wexlar,A., Alteration of isoenzyme patterns of a clone culture of non pathogenic *Entamoeba histolytica* upon changes in growth conditions. Arch. Invest.Med. ( Méx ); 17: 187 - 193 , ( 1986 ).
- 20.- Nash,E.T., Keister,B.D., Differences in Excretory Secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. The Journal of Infectious Diseases; 152 ( 6 ): 1166 - 1171, ( 1985 ).
- 21.- Neal, R.A., The duration and epidemiological significance of *Entamoeba histolytica* infections in rats. Trans. R.Soc.Trop. Med. Hyg; 45:363 - 70, ( 1951 ).
- 22.- Norman ,L., Gold,D., Kagan,G.I., The serologic response of hamsters to experimental liver inoculations with *Entamoeba histolytica* as measured by Indirect hemagglutination test and enzyme linked immunosorbent assay. Am. J. Trop.Med.Hyg; 28 ( 2 ): 198 - 205,(1979).
- 23.- Osisanya ,S.J.O., Antibody response of patients harbouring different zymodemes of *Entamoeba histolytica* to homologous and heterologous antigens. Journal of Tropical Medicine and Hygiene;88: 235 -241,( 1985 ).

- 24.- Panke,T.W., Teegarden,D.K., Lescher,T.J., Extensive cutaneous burn complicated by severe necrotizing amebic enterocolitis; Pathogenic factors resulting in severe amebic disease. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 27 (4): 766 -769,(1978).
- 25.- Pittman,F.E., El - Hashimi,W.K., Pittman,J.C., Studies in human amebiasis II. Light and electron microscopic observations of colonic mucosa and exudate in acute amebic colitis, gastroenterology; 65: 588-603, ( 1973 ).
- 26.- Przemyslaw,M., Comparative studies of the antigenic properties of some indigenous and imported strains of Entamoeba histolytica .Bulletin of the Institute of Marine Medicine; 21: 189 - 201, ( 1970 ).
- 27.- Ravdin,J.I., Croft,B.Y., Guerrant,R., Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica.J.Exp.Med; 152:377 -390,( 1980 ).
- 28.- Ravdin,J.I., Guerrant,R.L., Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica, J.Invest.Clin; 68:1305 - 1313, ( 1981 ).
- 29.- Report of WHO Scientific group, Intestinal Protozoan and helminthic infections. WHO tech.Rep.Ser; 666, ( 1981 ).

- 30.- Robinson, G.L., The laboratory diagnosis of human parasitic amoeba. *Trnas. R.Soc. Med. Hyg.* 62, 285-194, ( 1986 ).
- 31.- Rosenbaw, R.M., Writner, M., Ultrastructure of bactericid and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. *J.Cell. Biol.* 45; 367 -87, ( 1970 ).
- 32.- Sargeunt, p.g., Baveja, U.K., Nanda, R., and Anand, B.S., Influence og geographical factors in the distribution of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* ; Identification of zymodeme XIV in India. *London School of Hygiene and Tropical Medicine*; 78: 96 - 101, (1984 ).
- 33.- Sargeunt, P.G., Williams,, Bhannani, R., Kumate, J., Jimenez, E., A reviews of isoenzyme characterization of *Entamoeba histolytica* with particular reference to pathogenic and non pathogenic stocks isolates in México. *Arch. Invest. Med. (Méx)*; 13: 89-94, ( 1982 ).
- 34.- Struvier, P.C., Goud, T., Corticosteroids and Liver amebiasis . *Brithis Medical Journal* II; 2 : 394-395, ( 1978 ).
- 35.- Trissl, D., Martínez-Palomo, A., De la Torre, M., De la Hoz, R., Perea, E., Surface properties of Enta-

moeba . Increased rates of human erythrocytes phagocytosis in pathogenic strains. J. Exp. Med; 148: 1137-1145, ( 1978 ).

36.- Walsh, J.A., Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Reviews of Infection Diseases, 8 ( 2 ): 228 - 238, ( 1986 ).

CAPITULO

VIII

8.- APENDICE:

8 (A) .- Soluciones y Reactivos :

A.001.- Agar salino al 1.5%:

Se pesaron 1.5 g de agar bacteriológico y se adicionaron 0.7 g de NaCl , todo esto hirvió durante 5 minutos y se distribuyó en frascos con tapón de rosca colocando alicuotas de 2.5 mL cada una; se esterilizó durante 15 minutos a 15 libras para después dejarlas enfriar en forma inclinada.

A.002.- Almidón de arroz en polvo:

Surtido por la casa de SIGMA CHEMICAL - COMPANY Mo.

A.003.- Peptona al 10%:

Se pesaron 10 g de peptona y se diluyeron en 100 mL de agua destilada, se esterilizó a 15 libras durante 15 minutos. Este medio se utilizó para hacer crecer la cepa "B" de E. coli donada gentilmente por el Dr. Sargeunt ( College of Tropical Medicine London Inglaterra).

A.004.- Azul de bromotimol al 0.04%:

Se pesaron 0.04g de azul de bromotimol y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.

A.005.- Bactopeptona al 20%:

Se pesaron 20 g de peptona y se disolvieron en 100 mL de agua destilada, se esterilizó a 15 libras durante 15 minutos colocándose también en alicuotas de 2.5 mL.

A.006.- Acido Phtálico :

Se pesaron 51 g de phtalato de potasio y se disolvieron en 2.5 mL de NaOH al 40% y se ajustó el pH a 6.2 ; se llevó a un volumen de 500 ml. de agua destilada. De ésta solución se tomaron 20 mL y 180 mL de agua destilada estéril para usarse en el momento.

A.007.- Eritromicina al 0.05%:

Se disolvió un gramo de eritromicina en 20 mL de alcohol al 70 % y 180 mL de agua destilada. De ésta solución se tomaron 5 mL y se diluyeron en 95 mL de agua destilada. Se colocaron en alicuotas utilizando frascos de vidrio.

A.008.- Medio " R ":

Se pesaron 125 g de NaCl; 50 g de ácido cítrico monohidratado; 12.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado y 100 mL de ácido láctico. Todo esto se disolvió por separado para llevarse a un volumen de 2500 mL con a-

agua destilada. De ésta solución se tomaron 100 mL y se adicionaron 7.5 mL de NaOH al 40% así como 2.5 mL de azul de bromotimol al 0.04% (A.004). Previamente se ajustó el pH a 7.3 y se llevó a un volumen de 100 mL con agua destilada; se esterilizó en autoclave bajo las condiciones ya mencionadas anteriormente.

A.009.- Medio " BR ":

En 10 mL del medio "R" se adicionó una gota del cultivo de E. coli cepa "B", se dejó en la estufa a 37°C durante 48 horas; después se guardó a temperatura ambiente durante dos meses.

A.010.- Medio "BRS":

Se utilizó el medio "BR" al cual se le adicionó el mismo volumen de suero bovino inactivado a 56°C durante 30 minutos.

A.011.- Solución yodoyodurada al 2%:

Se preparó pesando 2 g de yodo por cada gramo de yoduro de potasio y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.

A.012.- Solución reguladora de fosfatos pH 7.0 y 0.1M:

Se pesaron 12.15g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 17.40g de  $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Ambas se disolvieron por

separado en agua destilada, se mezclaron para ajustar el pH a 7.0 y después se llevó a un volumen de 1000 mL con agua destilada.

A.013.- Solución de Tris:HCl 0.3 M y pH 8.0;

Se pesaron 4.74 g de trisma base y se disolvieron en 550 mL de agua destilada, ajustando el pH a 8.0 y se llevó a un volumen de 100 mL.

A.014.-  $MgCl_2$  0.1 M:

Se pesaron 5.038 g de  $MgCl_2$  y se disolvieron en 25 mL de agua destilada.

A.015.- NADP:

Se pesaron 100 mg de NADP y se disolvieron en 10 mL de agua destilada.

A.016.- Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa: 100UI/mL.

A.017.- Fructuosa 6 fosfato 10UI/mL:

Se pesaron 20 mg de F6P y se disolvieron en 2.0 mL de agua destilada.

A.018.- Nitroazul de tetrazolium 5mg/mL:

Se disolvieron 5 mg de NTT en 1.0 mL de agua destilada.

A.019.- Metasulfonato de Fenazina 5mg/mL:

Se disolvieron 5 mg de FMS en 1.0 mL de agua destilada.

A. 020.- Malato 1 M;

Se pesaron 1.56 g de ac. maleico y se disolvieron en 10 mL de agua destilada.

A.021.- Solución reguladora de trisma pH 7.4:

Se pesaron 12.14g de trisma; 11.61 g de ac. maleico; 2.03 g de  $MgCl_2$  ; 3.72 g de EDTA; 12.8 mL de NaOH 10 N. Se disolvieron por separado en agua destilada mezclandose después para ajustar el pH a 7.4 y se llevó a un volumen de 1000 mL con agua destilada.

A.022.- Glucosa 1 fofato 12.5 mg/mL:

Se pesaron 12.5 g de GIP y se disolvieron en 1 mL de agua destilada.

A,023.- Dextrosa 40mg/mL:

Se pesaron 40 mg de Dextrosa y se disolvieron en 1 mL de agua destilada.

A.024.- ATP:

Se pesaron 0.015 mg de ATP y se disolvieron en 1000 mL de agua destilada.

A.025.- Solución de amonio saturado:

Se pesaron 521 g de sulfato de amonio y se disolvieron en 1000 mL de agua destilada.

A.026.- NaOH 0.5 N:

Se pesaron 20 g de NaOH y se disolvieron en 1000 mL de agua destilada.

A.027.- Solución salina 0.9% :

Se pesaron 0.9 g de NaCl y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.

A.028.- Solución reguladora de Boratos 1.0 M:

Se pesaron 6.184 g de ácido bórico; 9.53g de Borax y 4.384 g de NaCl. Se disolvieron por separado y se llevó a un volumen de 1000 mL con agua destilada. El pH fué de 8.4.

A.029.- BaCl<sub>2</sub>:

Se pesó 1 g de BaCl<sub>2</sub> y se disolvió en 1 mL de agua destilada.

A.030.- DEAE Celulosa (SIGMA CHEMICAL Mo):

Se pesaron de 10 a 20 g de DEAE Celulosa ( 0.6 a 0.9 mEq/g) aproximadamente para 30 mg de proteína.

A.031.- HCl .1N:

8 mL de HCl se disolvieron en 1000 mL de agua destilada.

A.032.- Albúmina 1mg/mL:

Se pesó 0.1 g de albúmina y se disolvió en 100 mL de solución salina.

A.033.- NaOH 0.1 N:

Se pesaron 4 g de NaOH y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.

A.034.- Carbonato de sodio al 2 %:

Se pesaron 2 g de carbonato de sodio y se disolvieron en 100 mL de NaOH 0.1 N.

A.035.- Tartrato de sodio y potasio:

Se pesó 1 g de tartrato de sodio y potasio y se disolvió en 100 ml de agua destilada.

A.036.- Sulfato de Cobre 0.05 %:

Se pesaron 0.5 g de sulfato de cobre y se di solvieron en 100 ml de tartrato de sodio al 10%

A.037.- Reactivo A:

Constituido por 50 mL de solución de carbonato de sodio (A.033 ) y 1 mL de la solución de sulfato de cobre (A.035).

A.038.- Reactivo B:

Foli-Ciocalteau surtido por la casa SIGMA CHEMICAL Mo. se utilizó en una proporsión de ( 1:1 ).

A.039.- Glicina pH 2.8 y 0.2 M:

Se pesaron 7.1 g de glicina disolviendose en 300 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 2.8 y se llevó a un volumen de 500 mL con agua destilada.

A.040.- Glicina pH 2.2 y 0.2 M:

Se pesaron 7.51 g de glicina disolviendose en 300 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 2.2 y se llevó a un volumen de 500 mL con agua destilada.

A.041.-  $K_2HPO_4$  1 M;

Se pesaron 17.42 g de fosfato ácido de potasio 0.2 M y se disolvieron en 500 mL de agua destilada.

A.042.- Solución de Alsever :

Se pesaron 2.05 g de glucosa; 0.085g de ácido cítrico y 0.42 g de NaCl. Todo esto se disolvió en 100 mL de agua destilada. Se esterilizó a 15 libras durante 15 minutos.

A.043.- Suspensión de glóbulos rojos de carnero:

Se tomó el mismo volumen de glóbulos rojos de carnero que de solución de Alsever (A.042) y se guardó en refrigeración a 4 °C durante 10 días para su maduración.

A.044.- Solución de ácido Tánico.1%:

Se pesó 1 g de ácido tánico y se le adicionó 99 mL de solución salina isotónica al 0.9 %, se guardó en refrigeración a 4 °C durante toda la noche. De ésta solución se hicieron diluciones 1:20,000 para trabajar-

A.045.- Solución reguladora de fosfatos salinos 0.1 M  
pH 7.0:

Se pesaron 10.20 g de fosfato de potasio monobásico 0.15M y se disolvieron en 500 mL de agua destilada; también se pesaron 10.15 mL de fosfato de sodio dibásico disolviéndose

en 500 mL de agua destilada. De la solución de fosfatos monobásico se tomaron 24 mL y se mezclaron con 76 mL de la solución de fosfatos de sodio dibásico. A ésta nueva solución se le añadieron 100 mL de solución salina conservando el pH a 7.2.

A.046.- Solución reguladora de fosfatos salinos pH 6.4 y 0.1 M:

Se pesaron 10.20 g de fosfato de potasio monobásico 0.15 N y se disolvieron en 500 mL de agua destilada. También se pesaron 10.15 g de fosfato de sodio dibásico disolviéndose en 500 mL de agua destilada. De la solución de fosfatos monobásico se tomaron 67.8 mL y se mezclaron con 32.3 mL de la solución de fosfatos de sodio dibásico. añadiéndoles después 100 mL de solución salina conservando el pH a 6.4.

A.047.- Suero de conejo inactivado:

De los conejos control, se obtuvieron aproximadamente 25 mL de sangre por punción cardíaca, ésta se centrifugó a 55 x g durante 15 minutos para separar el suero, el cual fué inactivado a 56 °C durante 30 minutos.

8 ( B ) .- EQUIPO :

Balanza Analítica Bosh.

Potenciometro Corning Mod. 3.

Cámara de enfriamiento LKB.

Celdas de electroforesis con alambre de Pl.

Fuente de poder LKB Bromma.

Fuente de poder IMESA.

Liofilizador Labconco Freeze Ultra -low.

Congelador Revco Freeze Dryer 5.

Centrífuga Refrigerada Sorvall FT 6000 B Du Pont.

Cámara de electroforesis Helena Mod. 1283.

Espectrofotómetro Beckman Mod. 25 ( 1.u.v.)

Espectrofotómetro Coleman Mod. 6 A.

Cámara Polaroid MP4 Land.

Colector de fracciones Redirac LKB Bromma

2112 Unicord Bromma.