

2ej. 27



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMEN DE CALIFICACIONES  
FACULTAD DE QUIMICA

**PROPIEDADES ANTIGENICAS DE**  
**Entamoeba histolytica**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A :

CARMEN MARTHA ELINOS BAEZ

**FALLA DE ORIGEN**

1989



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## I N D I C E

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
MATERIALES Y METODOS	10
RESULTADOS	22
DISCUSION	26
CONCLUSIONES	29
RESUMEN	30
TABLAS	32
FIGURAS	34
BIBLIOGRAFIA	45

ABREVIATURAS

SSF	Solución salina isotónica amortiguada con fosfatos.
ASB	Albúmina sérica bovina.
SSF-Tw	Amortiguador de fosfatos salinos con 0.05% de Tween 20.
SSF-ASB	Amortiguador de fosfatos salinos con albúmina sérica bovina 1 mg/ml.
SSB	Amortiguador salino de boratos.
AF	Amortiguador de fosfatos con alta sal.
DSS	Dodecilsulfato de sodio.
SSI	Solución salina isotónica

## INTRODUCCION

El protozoario Entamoeba histolytica es un parásito intestinal del hombre, distribuido en todo el mundo, principalmente en países en vías de desarrollo como los de Africa, los de Sudamérica, la India y México (1). En países desarrollados los grupos de alto riesgo incluyen a homosexuales promiscuos, pacientes con SIDA, enfermos mentales en hospitales psiquiátricos y grupos de bajo nivel socioeconómico. La amibiasis se presenta con mayor severidad en niños muy pequeños, mujeres embarazadas, personas desnutridas y en individuos sometidos a terapia con corticosteroides. La incidencia de amibiasis aumenta en regiones tropicales y subtropicales (2). Se calcula que este parásito se encuentra como comensal en la luz del intestino grueso en aproximadamente 500 millones de individuos de todo el mundo y provoca alrededor de 75,000 muertes por año (3).

El ciclo biológico del parásito consiste de una forma infectiva denominada quiste (con cuatro núcleos) el cual es eliminado en las heces. Estos quistes pueden contaminar los alimentos, y al ser ingeridos por el hombre pueden dar origen a la enfermedad. Los quistes se establecen en la luz del intestino grueso, donde se desenquistan produciendo cada uno ocho formas vegetativas o trofozoitos móviles uninucleados. Estos trofozoitos se nutren, crecen y reproducen para luego entrar en proceso de enquistación, hasta llegar al estadio de quiste maduro que es eliminado por las heces, completándose así el ciclo biológico del parásito (4).

Se puede presentar el estado de portador sano, en el que posiblemente existe un balance entre los mecanismos patógenos de E. histolytica, y los mecanismos de defensa del individuo de tal forma que si se rompe este equilibrio se desarrolla la enfermedad. O bien, es posible que existan dos subespecies de E. histolytica una patógena y otra saprófita (5).

Las cepas virulentas de E. histolytica en el intestino grueso pueden originar disentería amibiana (1), apendicitis, colitis fulminante (6), y ameboma de colon (7). En algunos casos, los trofozoitos pueden destruir la mucosa intestinal y llegar a invadir otros órganos como son: hígado, pulmón, cerebro, corazón, órganos genitales y piel.

Para determinar la virulencia de una cepa se evalúan diversas actividades del trofozoito como: la capacidad de formar abscesos en hígado de animales (8), la habilidad eritrofagocítica (9) y la capacidad de los trofozoitos, ya sea enteros o sus extractos, para destruir monocapas de células en cultivo (10).

Las cepas de E. histolytica se pueden cultivar en condiciones xénicas (presencia de bacterias) o axénicas (ausencia de bacterias), sin embargo, en los cultivos axénicos la cepa pierde su virulencia y capacidad de enquistación. Se ha postulado que esto se deba a la pérdida de un factor de virulencia transferido por la bacteria a la amiba (11), o en otros casos se sugiere que la presencia de un virus pueda determinar la virulencia del parásito (12).

Por microscopía electrónica se han podido observar diferencias entre la superficie de los trofozoitos no virulentos y la de los aislados de lesiones de colón o de absceso hepático. Los filamentos del glucocalix son más prominentes en ambas virulentas. Las amibas patógenas se aglutinan en un mayor grado con concanavalina A, lo cual sugiere que hay mejor accesibilidad a los residuos de manosa o glucosa unidas al glucocalix (13).

La actividad proteolítica de las cepas virulentas es mayor que en las no virulentas, sin embargo, dicha actividad disminuye cuando estas se cultivan "in vitro", pudiéndose recuperar al ser pasados los trofozoitos, por hígado de hamsters. Entre las actividades enzimáticas se ha encontrado que la colagenasa asociada a la membrana plasmática está más elevada en cepas virulentas (14), a diferencia de la hialuronidasa que se encuentra en la misma proporción tanto en cepas virulentas como en no virulentas (15).

También se ha utilizado para distinguir cepas virulentas de no virulentas, el patrón izoenzimático, sin embargo, se ha observado que el zimodemo de cepas virulentas de E. histolytica no varía aunque la cepa sea sometida a condiciones axénicas que alteran sus propiedades virulentas (16). Se han identificado las siguientes isoenzimas: fosfoglucomutasa con una banda como marcador de virulencia, glucosa fosfatoisomerasa, hexocinasa y malato deshidrogenasa (17).

En los estudios referentes al mecanismo de citólisis se ha reportado en la superficie del trofozoito una lectina (18) que le

permite a éste unirse a la célula blanco y también se ha identificado una proteína denominada ameboporo con peso molecular de 13 kD que interviene en la formación de canales o poros en la célula blanco para efectuar su citólisis (19).

Con respecto a la inmunidad celular en el proceso de la amibiasis, se ha comprobado la participación de las células T al demostrar que un extracto acuoso de E. histolytica puede estimular "in vitro" (por transformación blastoide) a linfocitos de sangre periférica de enfermos con absceso hepático. Estos linfocitos T sensibilizados también son capaces de producir linfocinas, "in vitro" incluyendo interferón gamma, las cuales inducen actividad amebicida en macrófagos (20).

Otros estudios sobre amibiasis hepática realizados en hámsters neonatos, han demostrado que al eliminar la población de linfocitos T, el peso promedio del absceso es significativamente mayor que en los controles. Y que cuando se combina la timentomía y un tratamiento con suero anti-T se incrementan tanto el tamaño del absceso como las metástasis (21). Esto sugiere que los linfocitos T pueden participar en el control de la diseminación de las amibas, del sitio inicial de inoculación a otros órganos.

E. histolytica induce tanto una respuesta inmune humoral como celular, pero hasta ahora no se ha establecido cual de ellas protege contra una reinfección (22). La respuesta humoral sirve más como marcador de la enfermedad por la presencia simultánea de IgM e IgG específicos, lo que indica una infección reciente y activa, mientras que los títulos elevados de IgG específica



sugiere la presencia de una infección que se ha padecido y que no está activa. Durante la infección, los trofozoitos permanecen viables aun en presencia de anticuerpos específicos.

Al caracterizar las proteínas del trofozoito con sueros inmunes de pacientes con amibiasis intestinal o con absceso hepático amibiano, se ha observado que, aunque la respuesta de los pacientes es muy variable, la mayoría de los anticuerpos reconocen antígenos de superficie (23), y que las más reactivas tienen un peso molecular entre 40 y 88 kD, sin embargo, no existe relación entre éstas y la duración de la enfermedad, su sintomatología o con la cepa amibiana (24).

Otros estudios reportan que trofozoitos incubados con suero de individuos que no han padecido la enfermedad, son destruidos. Este daño, se lleva a cabo por activación de la vía alterna del complemento y no por la vía clásica que requiere de la presencia de anticuerpos específicos (25).

Tanto los anticuerpos como el complemento pueden prevenir la iniciación de la enfermedad por cepas virulentas de E. histolytica pero no son suficientes para limitar la infección invasiva. Sin embargo, las observaciones clínicas en individuos que han sanado de absceso hepático amibiano sugieren el desarrollo de una inmunidad protectora contra la reinfección por este parásito (26).

Además en animales de experimentación se ha demostrado el efecto protector de antígenos de E. histolytica contra la infección por este parásito (27). Esto sugiere la posibilidad de

controlar la amibiasis por medio de vacunación. Como en otras infecciones, la vacunación probablemente sería la forma más económica de prevenir la amibiasis.

El desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonales y de la ingeniería genética ha tenido gran impacto en el estudio de los agentes infecciosos y las enfermedades que causan. Actualmente por medio de estas tecnologías se están desarrollando vacunas moleculares contra enfermedades parasitarias como son la esquistosomiasis y el paludismo. Estas vacunas moleculares se componen de moléculas nativas completas de parásitos o de porciones definidas de una o más moléculas nativas. Para poder producir estas vacunas moleculares es necesaria la identificación de antígenos individuales que sean capaces de inducir protección. Entre las estrategias para esta identificación se ha propuesto la utilización de una serie de sueros obtenidos de diferentes fuentes tales como de individuos que viven en áreas endémicas, de individuos que han sanado de la infección o de conejos inmunizados con varias fracciones de antígenos del parásito. Con estos sueros se identifican antígenos en extractos de parásitos por medio de inmunoprecipitación o por inmuno-electrotransferencia. Además, los sueros se pueden utilizar para la detección de proteínas de parásitos sintetizadas en Escherichia coli (28).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La disponibilidad de una vacuna contra la amibiasis resolvería el grave problema de salud pública que esta enfermedad representa en nuestro país (28a) ya que las medidas de control de la parasitosis hasta la fecha implementadas, tales como el mejoramiento de las condiciones de higiene y de la calidad del agua, aunque han disminuido la incidencia de la enfermedad, por razones económicas solo alcanzan una porción de la población afectada (3). Los resultados obtenidos en animales experimentales y las observaciones clínicas, que indican una baja recurrencia de amibiasis invasora en pacientes curados de absceso hepático amibiano apoyan la idea de que es factible prevenir la infección por medio de vacunación. Sin embargo, la producción masiva y aplicación de una vacuna basada en homogenados de trofozoítos presentaría una serie de dificultades tales como la presencia de contaminantes provenientes del medio de cultivo, variaciones en el contenido de diferentes antígenos debido a factores en el cultivo difíciles de controlar, presencia de proteasas muy activas en los trofozoítos las cuales degradan los antígenos protéicos (28b), posibles problemas de competencia antigénica (28c) debido a los múltiples componentes del homogenado que disminuirían la respuesta contra los antígenos que inducen protección. Por estas razones, una vacuna ideal contra la amibiasis sería aquella constituida por una o unas cuantas moléculas que verdaderamente fueran capaces de inducir protección y que además se pudieran producir en grandes cantidades, a bajo costo y ausente de componentes innecesarios y extraños. La

producción de una vacuna de este tipo solo sería posible si se conociese cuales son los antígenos que protegen, así como su naturaleza química y/o estructura. Un enfoque para la posible identificación de estos antígenos es examinar la especificidad antigénica de los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes que se han recuperado de amibiasis invasora, así como de animales experimentales infectados o inmunizados. Una vez realizada la identificación de posibles antígenos protectores, se trataría de producir o aislar estos antígenos lo cual se facilitaría utilizando técnicas de ingeniería genética. Estos antígenos individuales así producidos serían sometidos a pruebas para evaluar si inducen protección en un modelo de amibiasis experimental. El primer paso para obtener una vacuna eficaz es determinar cuales son los antígenos de E. histolytica que son reconocidos por los sueros de conejos inmunizados con homogenados de este parásito y compararlos con los que son reconocidos por los sueros de pacientes. Esto constituye el presente trabajo de tesis.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. CULTIVO DE Entamoeba histolytica.

Se utilizó la cepa IM1-IMSS, la cual se mantuvo en cultivo axénico en el medio TYI-S-33 de Diamond (29). Las amibas se resembraron cada tercer día. Los tubos de cultivo se enfriaron en agua de hielo durante 10 min para desprender las amibas adheridas a las paredes. El número de amibas por mililitro de cultivo se determinó utilizando una cámara de Neubauer. Se resembraron cada vez 100 000 amibas a un tubo con 12 ml de medio fresco.

### 2. PREPARACION DE ANTIGENOS DE E. histolytica.

Para el aislamiento de antígenos membranales y solubles, los trofozoitos lavados se resuspendieron en tres mililitros de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 conteniendo 2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 10 mM de p-hidroximercuribenzoato. Los trofozoitos se homogenizaron con 80 golpes en un homogeneizador Dounce. El homogenado se centrifugó a 100,000 X g en la centrifuga Beckman L8-60M. El sobrenadante y el paquete se denominaron respectivamente antígeno soluble y antígeno membranar. El antígeno membranar se resuspendió en 1 ml de amortiguador anterior y se congeló a -70°C.

### 3. PRODUCCION DE SUEROS ANTI-E. histolytica.

3.1 Animales. Se utilizaron conejos de Nueva Zelanda de 4 Kg de peso y ratones de la cepa Balb/c. Los conejos fueron sangrados antes de la inoculación para obtener sueros preinmunes.

3.2 Inmunización y Antígenos. Para las inmunizaciones se colectaron los trofozoitos de un cultivo exponencial por centrifugación a 1000 rpm por 10 min y a 4°C. Los trofozoitos se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.019 M, pH 7.2 conteniendo 0.27 M de NaCl para eliminar las proteínas del medio de cultivo y finalmente se resuspendieron a una concentración de  $12 \times 10^6$  trofozoitos por mililitro en el mismo amortiguador. Para producir sueros anti-E. histolytica, se inmunizaron tres conejos con diferentes preparaciones. Para uno de los conejos (E-2), el paquete de amibas ya lavadas ( $12 \times 10^6$ ) contenidas en 1 ml de suspensión se emulsionó con 1 ml de adyuvante incompleto de Freund, inyectando el inóculo a intervalos de una semana durante cuatro semanas, la primera inoculación se efectuó por vía intramuscular y las demás por vía subcutánea. Otro conejo (E-3), se inmunizó con antígenos desnaturalizados, para lo cual 1 ml de la suspensión de amibas ya lavadas se colocó en un tubo y se calentó en baño de agua hirviendo 1 min, pasándolo inmediatamente a congelación 10 min. Este procedimiento se repitió tres veces y luego el antígeno se emulsionó con el adyuvante incompleto de Freund. La inmunización del conejo E-3 se llevó a cabo en la misma forma empleada en el caso anterior. El último conejo (E-1) se inmunizó con antígeno de membrana plasmática obtenido por el método de Aley (30), y resuspendido en 1 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, el cual se emulsionó con 1 ml de adyuvante incompleto. La inmunización se realizó igual que las anteriores.

#### 4. PURIFICACION DE IgG DE SUERO NORMAL DE CONEJO

4.1 Obtención del suero. Los conejos se sangraron de la vena central de la cara posterior de la oreja con una jeringa de 20 ml. La sangre se dejó coagular y posteriormente se centrifugó para obtener el suero, el cual se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

4.2 Precipitación de las gammaglobulinas. Se preparó una fracción enriquecida en gammaglobulinas por medio de precipitación con sulfato de amonio a una concentración final de 40 % de saturación (31). A 20 ml de suero mantenidos en hielo y en agitación suave se agregó, gota a gota, 13.3 ml de solución saturada de sulfato de amonio, pH 7.0. La agitación se prolongó durante una hora y la suspensión obtenida se centrifugó por 10 min a 12000 rpm en el rotor SS-34 de la centrifuga Sorvall RC-5. El botón resultante, el cual contiene las gammaglobulinas, se disolvió en SSB pH 8.0 y se dializó contra la misma solución hasta que la reacción del dializado con solución de cloruro de bario al 10 %, dió negativa, indicando con esto que los sulfatos se habían eliminado. En seguida, se dializó contra una solución amortiguadora de fosfatos 0.0175 M, pH 6.9, durante 24 horas cambiando el amortiguador a las 12 horas. La solución de gammaglobulinas en la membrana de diálisis se centrifugó para eliminar partículas insolubles y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Se obtuvo un rendimiento de 159 mg de proteína.

4.3 Purificación de la IgG. La fracción cruda de gammaglobulinas se purificó por cromatografía de intercambio iónico (32). Se montó una columna con 14.4 ml de DEAE-celulosa (DE-52-Whatman, Piscataway, N.J.), equilibrada en solución amortiguadora de fosfatos 0.0175 M, pH 6.9. Se agregaron 159 mg de gammaglobulina disuelta en el mismo amortiguador y se pasó por la columna lentamente. Después de que toda la muestra había entrado esta se eluyó con el mismo amortiguador. En estas condiciones de fuerza iónica y pH la mayoría de la IgG pasa a través de la columna, mientras que la albúmina y otras proteínas son retenidas. Se colectaron fracciones de 1 ml y se determinó la densidad óptica a 280 nm de cada una de ellas, para evaluar su contenido de proteína (Fig. 1). Las fracciones 7-14 se juntaron y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Se obtuvo un rendimiento de 79 mg. La pureza de la IgG se analizó en un gel de poliacrilamida-DSS (Fig 2).

#### 5. PREPARACION DE UN CONJUGADO DE PEROXIDASA Y ANTICUERPOS DE CABRA ANTI-IgG DE CONEJO

5.1 Preparación del Inmunoadsorbente de IgG de conejo. Se utilizó el gel Sepharosa-4B activado con bromuro de cianógeno (33) (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.). Dos gramos de Sepharosa activada se hidrataron con 20 ml de una solución 1 mM de HCl y se lavaron rápidamente con 400 ml de la misma solución utilizando un embudo de vidrio poroso. Inmediatamente se transfirió la Sepharosa a un tubo de plástico, se agregó la IgG disuelta en solución 0.1 M de NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.3, conteniendo 0.5 M de NaCl (solución amortiguadora de acoplamiento) y se mezcló por



inversión, manteniéndose la suspensión en un agitador rotatorio toda la noche a 4 C. Posteriormente la suspensión se centrifugó suavemente y se midió el contenido proteico al sobrenadante para determinar la cantidad de IgG acoplada a la Sepharosa. Después, se lavó la Sepharosa dos veces con el mismo amortiguador de acoplamiento. A continuación la Sepharosa-IgG se trató con 5 ml de una solución 1 M de etanolamina, pH 8.0, para bloquear los grupos reactivos remanentes, manteniéndose en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. El inmunoadsorbente se lavó exhaustivamente con solución amortiguadora de boratos y se resuspendió en este mismo amortiguador.

5.2 Purificación de anticuerpos anti-IgG de conejo por cromatografía de afinidad (34). Se utilizó un suero de cabra anti-IgG de conejo (GARFc), proporcionado por el Dr. Lamoyi. Este suero se produjo por hiperinmunización de una cabra con fragmentos Fc de IgG de conejo, purificados por cristalización y cromatografía en Sephadex G-150.

El inmunoadsorbente de Sepharosa-IgG de conejo (6 ml) se empacó en una columna de vidrio y se lavó exhaustivamente con SSB. Enseguida, se agregaron 6 ml del suero GARFc controlando el flujo de la columna para que éste entrara al gel en 40 min y entonces se agregó SSB a la columna. El efluente se colectó en fracciones de 1 ml y se determinó la densidad óptica a 280 nm de cada fracción. Cuando la densidad óptica disminuyó a 0.2 unidades se agregó una solución 0.2 M de glicina-HCl, pH 2.5 conteniendo 0.15 M de NaCl para eluir los anticuerpos de cabra unidos a la

IgG de conejo. A partir de este momento, las fracciones colectadas se neutralizaron inmediatamente añadiendo 80  $\mu$ l de Tris 2 M, pH 8.0 a cada ml de eluido. Posteriormente se determinó la densidad óptica de estas fracciones a 280 nm. (Fig 3). Las fracciones del 17 al 24 se reunieron y dializaron contra SSB durante 24 horas. Se obtuvo un rendimiento total de 32 mg de anticuerpos purificados.

5.3 Acoplamiento de la peroxidasa a los anticuerpos anti-IgG específicamente purificados. El conjugado de anti Fc-peroxidasa (GARFc-Px), se preparó de acuerdo a la técnica de dos pasos de Avrameas (35). Diez mg de peroxidasa de rábano (Grado I, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA), se disolvieron en 0.2 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.9. La peroxidasa se activó añadiendo 25  $\mu$ l de glutaraldehído al 2.5 %, recién preparado, disuelto en el mismo amortiguador. La mezcla de reacción se protegió de la luz y se dejó incubando toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se dializó contra SSI amortiguada con carbonatos 10 mM, pH 7.0 durante 8 horas, cambiando la solución una vez. El volumen final de la peroxidasa activada se ajustó a 1 ml, se añadieron 5 mg (267  $\mu$ l) de anticuerpos GARFc específicamente purificados, y se incubó, protegiéndose la reacción de la luz, por dos horas a temperatura ambiente y 24 horas a 4°C. Después se agregaron 100  $\mu$ l de lisina 0.2 M disuelta en SSF y se dejó reaccionar 3 horas a temperatura ambiente para bloquear los grupos aldehído remanentes. Enseguida, la mezcla se colocó en un baño de hielo y se agregó solución saturada de sulfato de amonio para obtener 50% de saturación. En

estas condiciones la peroxidasa libre permanece en el sobrenadante y la acoplada a la inmunoglobulina precipita. La suspensión se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min; se separó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 1 ml de agua desionizada. A esta solución se agregaron 15 mg de albúmina sérica bovina y se dializó contra SSF durante 48 horas, cambiando el amortiguador dos veces. Al GARFc-Px se le agregó glicerol al 50% y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

5.4 Evaluación de la calidad del conjugado GARFc-Px. La potencia del conjugado GARFc-Px se determinó por medio de pruebas de ELISA (36) en placas de microtitulación y por ensayo de inmunopunto (37). Para el ELISA se prepararon placas de microtitulación de poliestireno (Dynatech Laboratories Inc. Cat # 011-010-66044), cubiertas con IgG normal de conejo. Se prepararon diluciones de 10  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  y 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de IgG normal de conejo en SSF. De cada dilución se añadieron 100  $\mu\text{l}$  a 6 pozos de la placa de microtitulación y ésta se incubó por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el exceso de las diluciones de IgG y los pozos se lavaron con SSF-Tw. Entonces se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de SSF-ASB a cada uno de los pozos para bloquear los sitios del plástico no cubiertos por la IgG. En este paso se prepararon 6 pozos adicionales cubiertos solamente con ASB para ser usados como controles en el ensayo. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente los pozos se lavaron nuevamente con SSF-Tw. Se prepararon diluciones 1:4,000, 1:8,000 y 1:16,000 del conjugado en SSF y de cada dilución se agregaron 50  $\mu\text{l}$  a los pozos tratados con las diferentes diluciones de IgG de conejo.

Esto se hizo por duplicado. La placa se incubó por dos horas a temperatura ambiente protegida de la luz. Se lavaron los pozos nuevamente con SSF-Tw y se agregó el sustrato revelador ortofenilendiamina en amortiguador de citrato y fosfato (38). La placa se incubó 5 min protegida de la luz para el desarrollo de color y la reacción enzimática se paró añadiendo 50  $\mu$ l de solución 2.5 N de  $H_2SO_4$ . La absorbancia de la muestra en los pozos se determinó a 490 nm en un lector automático de ELISA (Dynatech MR 650), adaptado a una computadora APPLE modelo IIE.

La mínima cantidad de IgG normal de conejo que es detectada por el conjugado GARFc-PX a una dilución 1:4,000 se determinó en un ensayo de inmunopunto. Una tirilla de papel de nitrocelulosa se lavó con agua desionizada y en agitación por 5 min y se dejó secar. Posteriormente se aplicaron 2  $\mu$ l de diferentes diluciones de la IgG de conejo (100, 10, 1 y 0.1  $\mu$ g/ml de SSF). La tira se dejó secar, se lavó una vez con SSF y se bloqueó con suero bovino fetal al 2% en SSF durante 30 min. El exceso de suero fetal se eliminó lavando la tira con SSF una vez y luego ésta se incubó por dos y media horas con GARFc-Px diluido 1:4,000 en SSF-ASB. La tira se lavó tres veces con SSF durante 10 min cada vez. El GARFc-Px unido a la IgG en la nitrocelulosa se puso de manifiesto incubando la tira por 20 min con el sustrato ortocloronaftol-metanol (3 mg/ml) en 40 ml de SSF y 40  $\mu$ l de  $H_2O_2$  protegiéndose la reacción de la luz. La reacción se paró al lavar las tiras con agua de la llave.

## 6. ENSAYOS DE ELISA.

6.1 Determinación del título de los sueros anti-E. histolytica. Esto se hizo por medio de un ensayo de ELISA. Se siguió la técnica anteriormente descrita sólo que para cubrir los pozos de la placa de microtitulación se utilizó antígeno membranal de trofozoitos de E. histolytica a una concentración de 100 µg/ml, colocando 100 µl en cada pozo. Los sueros inmunes y preinmunes se utilizaron a las diluciones 1:1,000, 1:2,000, 1:4,000 y 1:8,000. El conjugado GARFc-Px se utilizó a una dilución 1:4,000.

6.2 Oxidación de antígeno amibiano con peryodato (39). Una hilera de pozos de la placa de microtitulación ya cubiertos con el antígeno membranal de E. histolytica y lavados con SSF-Tw, se lavó con amortiguador de acetatos 50 mM, pH 4.5. A continuación se añadieron a cada pozo 100 µl de las soluciones de peryodato 0.1 mM, 1 mM, 5 mM y 10 mM, teniendo un control de pozos sin peryodato. Se incubó una hora en la oscuridad y a temperatura ambiente. En seguida se añadieron a cada pozo 200 µl de glicina al 1% en amortiguador de fosfatos pH 7.5. Los pozos se lavaron y a cada uno de ellos se agregó el suero inmune a ensayar a una dilución 1:5,000. Como controles adicionales se incluyeron los sueros preinmunes. El conjugado GARFc-Px se usó a una dilución 1:4,000.

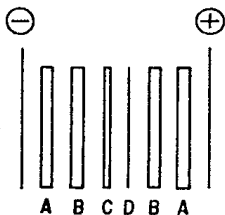
## 7. ELECTROFORESIS.

El análisis electroforético de antígenos y proteínas purificadas se realizó en geles de acrilamida-dodecil sulfato de sodio (DSS), preparados de acuerdo a la metodología de Laemmli (40). Se utilizaron un gel concentrador al 3% de acrilamida y un gel separador al 10% de acrilamida.

Las muestras se calentaron en baño de agua hirviendo por tres min en presencia de 2-Mercaptoctanol y DSS. La cámara de electroforesis con el gel de acrilamida y la solución de electroforesis se colocó sobre un agitador magnético para mantener el amortiguador en movimiento constante. Para evitar el sobrecalentamiento del gel, se reguló la temperatura del amortiguador mediante un sistema refrigerante de recirculación. La electroforesis se corrió a 20 mA en el concentrador, aumentándose a 40 mA en el gel separador.

## 8. TRANSFERENCIA ELECTROFORETICA DE PROTEINAS A PAPEL DE NITROCELULOSA.

8.1 Identificación de los antígenos reconocidos por los anticuerpos anti-E. histolytica. Esto se realizó por el método de inmunolectro-transferencia (41). Las proteínas separadas en los geles de poli(acrilamida) se transfirieron a papel de nitrocelulosa usando la cámara IDEA Scientific. En esta cámara se colocó el papel de nitrocelulosa en contacto con el gel, considerando la posición de los electrodos y a cada lado una hoja de papel filtro 3 MM y una fibra verde scotch 3 M. Todo el sistema se sumergió en el amortiguador de transferencia como se indica en la Figura.



- A Fibra verde
- B Papel filtro 3 MM
- C Gel poliacrilamida
- D Papel de nitrocelulosa

La transferencia se llevó a cabo durante una hora usando 1 A de corriente. El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se sumergió en SSF-ASB 3%, durante toda la noche a 4 °C, con agitación suave. El papel de nitrocelulosa se cortó en tiras y éstas se lavaron tres veces con SSF-Tw durante 10 min cada vez. Posteriormente las tiras se sumergieron en el correspondiente anticuerpo diluido (1:1000 y 1:5000 en SSF), durante toda la noche a 4°C y con agitación. A continuación, las tiras se lavaron 5 veces con SSF-Tw y se incubaron toda la noche a 4 °C y en agitación con el conjugado GARFc-Px diluido 1:4000 en SSF-ASB. Posteriormente las tiras se lavaron 5 veces en la misma forma que las anteriores y se revelaron con una solución conteniendo 8 ml o-cloronaftol-metanol (3 mg/ml) en 40 ml de SSF y 40  $\mu$ l de  $H_2O_2$ , protegiéndose la reacción de la luz durante 5 min. La reacción se paró al lavar las tiras con agua de la llave.

8.2 Oxidación con metaperyodato (39). El papel de nitrocelulosa que contenía las proteínas transferidas se cortó en

tiras, las cuales se lavaron con amortiguador de acetatos 0.05N, pH 4.5 y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora en la oscuridad con metaperyodato a concentraciones de 10 y 20 mM en amortiguador de acetatos. Como control se prepararon tiras que se incubaron sólo con amortiguador de acetatos. Después de la incubación las tiras experimentales y controles se lavaron tres veces con el amortiguador de acetatos y en seguida se les adicionó glicina al 1% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.5 durante 30 min. Todas las tiras se lavaron con SSF-Tw y se incubaron cuatro horas a temperatura ambiente con suero inmune de conejo diluido 1:2,500 en SSF. En seguida las tiras se lavaron con SSF-Tw y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el conjugado GARFc-Px diluido 1:4,000 en SSF.ASB. A continuación todas las tiras se lavaron con SSF-Tw y luego se procedió a efectuar el revelado con o-cloronaftol-metanol.

#### 9. CUANTIFICACION DE PROTEINAS

El contenido protéico de las diferentes muestras se determinó por medio de la técnica descrita por Bradford (42). Se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina diluida en SSI a la concentración de 1,3,5,10 y 25 µg/ml. De cada una de estas diluciones se tomaron 0.8 ml, los cuales se mezclaron con 0.2 ml de una solución 0.01% de Azul de Coomassie Brillante U-250, 4.7% de etanol y 8.5% de ácido fosfórico. Después de incubar un mínimo de 5 min se midió la densidad óptica a 595 nm. Las muestras se procesaron de la misma manera y su concentración se determinó por interpolación en la curva estándar.



## RESULTADOS

Evaluación del conjugado GARFc-Px. La actividad del conjugado GARFc-PX se evaluó por medio de un ensayo de ELISA y una prueba de inmunopunto, utilizando como antígeno IgG normal de conejo. Los resultados del ELISA se muestran en la Tabla I, donde se observa que el GARFc-Px a una dilución 1:16,000 reaccionó fuertemente con los pozos cubiertos con una concentración muy baja (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) de IgG normal de conejo. A los 10 min el color desarrollado por la reacción enzimática en estos pozos fué muy intensa mientras que en los pozos controles recubiertos sólo con albúmina sérica bovina no hubo aparición de color. Estos resultados indican que el acoplamiento de la peroxidasa al GARFc no destruyó su actividad enzimática ni la actividad del anticuerpo y además que el GARFc-Px no se pega inespecíficamente a las superficies de los pozos. En base a estos resultados se decidió utilizar la dilución 1:4,000 del conjugado de GARFc-Px en las pruebas inmunoenzimáticas.

Como se planeaba utilizar el conjugado GARFc-Px para detectar anticuerpos de conejo unidos a antígenos adheridos a papeles de nitrocelulosa se hizo un ensayo previo para determinar su comportamiento en un ensayo de inmunopunto en papel de nitrocelulosa. En la Fig. 4 se demuestra que una dilución 1:4,000 del GARFc-PX da reacción visible con 2 ng de IgG normal de conejo. Además puede observarse que no hubo unión inespecífica en otras áreas del papel de nitrocelulosa. Estos resultados en conjunto indican que el conjugado GARFc-Px reúne las

características óptimas para ser utilizado tanto en ensayos de ELISA como en inmunoelectrotransferencia.

Titulación de sueros anti-E. histolytica. Los títulos de los sueros preparados contra membranas plasmáticas, antígenos nativos y contra antígenos desnaturalizados de E. histolytica se compararon en un ensayo de ELISA usando antígeno membranal de E. histolytica (Tabla II). Los sueros preinmunes respectivos usados como controles no reconocieron en forma significativa antígenos de E. histolytica. Los tres sueros inmunes presentan lecturas similares en las diluciones probadas lo que indica que la concentración de anticuerpos en ellos es aproximadamente la misma.

Para determinar si los epitopes reconocidos por los anticuerpos eran de naturaleza glucosídica (asociada a glucoproteínas o glucolípidos), se oxidaron los posibles carbohidratos de los antígenos con metaperyodato de sodio a pH 4.5. Los resultados se presentan en la Figura 5. La oxidación del antígeno en la placa de ELISA por el metaperyodato produjo una disminución en el reconocimiento antigénico por los tres sueros. La máxima inhibición (41 a 56%) se observó a una concentración 10 mM de metaperyodato, sin embargo con 5 mM ya se obtuvo una inhibición considerable (30 a 48%). Esto indica que varios de los antígenos membranales son glucoproteínas y que los anticuerpos en los sueros reconocen la porción glicosídica de éstos, sin embargo, aproximadamente la mitad de los anticuerpos reaccionan con determinantes de naturaleza peptídica.

#### Análisis electroforético de los antígenos de E. histolytica.

Los antígenos membranal y soluble se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (Fig. 6). Ambos antígenos mostraron patrones electroforéticos complejos, se observaron aproximadamente 36 bandas de los cuales algunas son comunes en ambas preparaciones antigénicas. El antígeno membranal presenta bandas de alto peso molecular de más de 96 kD mientras que la mayoría de las bandas del antígeno soluble son de menor peso molecular. Las bandas comunes pueden representar contaminación del antígeno soluble con el membranal.

Inmunoelectrotransferencia con antígenos membranal y solubles. Los sueros E-2 y E-3 (Fig. 7 C y E), reconocieron en el antígeno membranal un patrón de bandas bastante similar (30 bandas), con pesos moleculares que oscilan entre 16,000 y 140,000 daltones. En contraste el suero del conejo E-1 (Fig 7 A y C), reconoce un número de bandas menor, y la mayoría son poco intensas, sólo la banda con peso molecular de 140,000 daltones es claramente reconocida. En la Fig. 8, se muestran los pesos moleculares de las bandas que son reconocidas por ambos sueros E-2 y E-3. En este experimento, la reacción de los sueros inmunes con el antígeno soluble (Fig. 7 B, D y F), fué apenas visible por lo que se preparó otro inmunoblot para antígenos solubles aumentando los tiempos de exposición de las tiras con el sustrato (Fig. 9). En este inmunoblot se observan claramente las bandas reconocidas por los sueros E-1, E-2 y E-3 a diluciones 1:1,000 (9 A, C y E) y 1:5,000 en (9 B, D y F). Los resultados indican que

una alta proporción de los anticuerpos están dirigidos contra la membrana.

Tratamiento con peryodato El antígeno membranar, transferido a tiras de nitrocelulosa, se trató con peryodato, para definir si las proteínas en las bandas son reconocidas a través de epitopes de naturaleza peptídica o glucosídica.

En la Fig. 10, puede observarse que a dos diferentes concentraciones de peryodato (10 mM y 20 mM), el suero E-1 continúa reaccionando con tres bandas, (140, 125 y 26 kD) mientras que las otras 4 bandas mayoritarias desaparecen. En el antígeno tratado con 10 mM de peryodato, el suero E2 reconoce 3 bandas (125, 70 y 28 kD). Con 20 mM de peryodato disminuyen notablemente la intensidad de las dos bandas de alto peso molecular, manteniéndose únicamente la de 28 kD. Por último, el reconocimiento de las bandas por el suero E-3 no se afecta con el peryodato a una concentración de 10 mM, pero aumentando la concentración a 20 mM, se mantienen únicamente dos bandas (47 y 28 kD) y las restantes 8 bandas disminuyen drásticamente.

## DISCUSION

El desarrollo de métodos inmunoproliféricos para el control de la amibiasis depende de un conocimiento profundo de la estructura antigénica del parásito, de sus mecanismos de patogenicidad y de los fenómenos inmunológicos, que tienen lugar como resultado de su interacción con el huésped. Recientemente, con el advenimiento de la tecnología de DNA recombinante, se ha propuesto una estrategia para la identificación, caracterización y producción de antígenos definidos presentes en parásitos que podrían inducir protección al huésped y por lo tanto que sirvieran para la producción de vacunas anti-parasitarias, compuestas de una o varias especies moleculares definidas ya que hasta la fecha no ha sido posible la fabricación de vacunas, a nivel comercial, a partir de homogenados. Esta estrategia para la identificación de antígenos protectores se basa en parte, en el uso de anticuerpos policlonales de humanos y de animales experimentalmente infectados o inmunizados de anticuerpos monoclonales y en la clonación de genes del parásito.

Para aplicar este enfoque al problema de la amibiasis, se han caracterizado las especificidades antigénicas de una serie de sueros de pacientes convalescentes de amibiasis invasora (de la Torre, P. y Lamoyi, E.; observaciones no publicadas) y de tres sueros hiperinmunes de conejos contra E. histolytica. Estos sueros de pacientes y de conejo se utilizarán para el aislamiento de clones de cDNA en Escherichia coli que expresen antígenos de E. histolytica. Como la selección se realizará tratando filtros de nitrocelulosa que lleven unidas las posibles proteínas

expresadas, se consideró que mediante la desnaturalización de los antígenos usados para la inmunización de los conejos se podrían inducir anticuerpos que reaccionaran fuertemente con proteínas desnaturalizadas y adheridas a nitrocelulosa. Es conocido que cuando se inmunizan animales con proteínas nativas éstos responden produciendo anticuerpos que en su mayoría están dirigidos contra determinantes antigénicos discontinuos, los cuales se componen por grupos de aminoácidos que están separados en la estructura primaria pero que se juntan en la estructura tridimensional. Estos anticuerpos no reaccionan con la proteína cuando ésta se desnaturaliza.

Por otra parte, para el aislamiento de clonas de expresión de cDNA con anticuerpos se requiere que estos reaccionen con la porción peptídica de posibles glicoproteínas ya que los productos de expresión en Escherichia coli no son glucosilados. Para determinar la naturaleza del epítopo reconocido por los anticuerpos anti-E. histolytica se trataron las tiras de nitrocelulosa con metaperyodato de sodio antes de la reacción con los sueros. Este agente a pH ácido oxida los grupos hidróxilo vecinos de los azúcares a dialdehído (43), causando el rompimiento de azúcares no reductores terminales así como de hexosas internas en los oligosacáridos cuando el Carbono 3 no está sustituido (Fig. 11). Se ha determinado que el tratamiento con metaperyodato a 10 mM a pH 4.5 por 1 hr a 25 °C es lo suficientemente suave para destruir epítopes compuesto por carbohidrato sin que se afecten epítopes protéicos. El tratamiento produjo la disminución de la intensidad de algunas

bandas, en el caso del suero E-1 continúa reconociendo las bandas de 140, 125 y 26 kDa, el suero E-2 reacciona solo con la banda de 28 kDa y el E-3 identifica las bandas de 47 y 28 kDa. Estos experimentos con metaperiodato, además de identificar glicoproteínas en las fracciones antigénicas de E. histolytica indican que probablemente una proporción de los anticuerpos reconocen epítopes proteicos y que por lo tanto son adecuados para la inmunoselección de clonas en genotecas de expresión.

Uno de los problemas para realizar esta inmunoselección es la alta reactividad cruzada de los reactivos serológicos con los antígenos de Escherichia coli. Para tratar de solucionar al menos en parte este problema, se purificaron anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo por cromatografía de afinidad y se produjo un conjugado peroxidado. Se demostró que el conjugado es activo en ensayos de ELISA y de inmunoelectrotransferencia.

## CONCLUSIONES

Se caracterizó la especificidad antigénica de los anticuerpos en tres sueros de conejo hiperinmunizados con antígenos de E. histolytica. Estos sueros junto con otros, obtenidos de pacientes convalcientes de amibiasis serán muy útiles para la posterior selección y caracterización de clonas que expresen antígenos de Entamoeba en Escherichia coli.



## RESUMEN

### "Propiedades antigénicas de Entamoeba histolytica"

La caracterización de antígenos de E. histolytica se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y por los métodos inmunoenzimáticos de ELISA e inmuno-electrotransferencia. Para estos dos últimos se prepararon sueros inmunes de conejo contra diferentes fracciones de E. histolytica HM1:IMSS. Para detectar la reacción de los sueros de conejo contra estos antígenos, en los métodos inmunoenzimáticos, fue necesario además elaborar un reactivo consistente en anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados a la enzima peroxidasa. Los títulos de los sueros preparados contra membranas plasmáticas (E-1), antígenos nativos (E-2) y antígenos desnaturalizados (E-3) de E. histolytica se compararon en un ensayo de ELISA, obteniéndose densidades ópticas muy semejantes. Los antígenos de la fracción membranal de E. histolytica, separados por electroforesis y transferidos a nitrocelulosa, fueron caracterizados con los tres sueros, encontrándose que los sueros E-2 y E-3 reconocen prácticamente a los mismos polipéptidos (30 bandas) con pesos moleculares de 16 al 115 kD, en contraste con los polipéptidos reconocidos por el suero E-1, ya que éste reconoce casi exclusivamente a una proteína con peso molecular de 96 kD y reacciona muy débilmente con otros antígenos.

Posteriormente se determinó si los epitopos reconocidos por los anticuerpos eran de naturaleza glucosídica mediante oxidación de los posibles carbohidratos de los antígenos con peryodato de

sodio a pH = 4.5, están dirigidos contra glucoproteínas. El efecto de este tratamiento se evaluó en los dos sistemas de ELISA y electrotransferencia. Se encontró que una alta proporción de anticuerpos reaccionan con grupos carbohidrato, pero también se encontró reactividad contra la porción peptídica de las glucoproteínas.

Estos sueros caracterizados serán muy útiles para la posterior selección y caracterización de clonas que expresen antígenos de Entamoeba en E. coli.

TABLA I

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DEL CONJUGADO GARFc-Px POR ELISA

Pozos cubiertos con IgG de conejo	Dilución del conjugado GARFc-PX		
	1:4,000	1:8,000	1:16,000
ug/ml	D.O. (490 nm)		
10	2.00	1.37	0.78
1	2.00	1.52	0.92
0.1	0.71	0.51	0.32

TABLA II

TITULACION DE LOS SUEROS ANTI-E. histolytica POR ELISA<sup>a</sup>

SUERO INMUNE	Dilución de los sueros			
	1:1,000	1:2,000	1:4,000	1:8,000
	D.O. (490 nm)			
E-1	1.41	1.11	0.77	0.49
E-2	1.29	0.96	0.7025	0.33
E-3	1.50	1.23	1.09	0.83

<sup>a</sup> Las lecturas con los sueros preinmunes se restaron de estos valores.

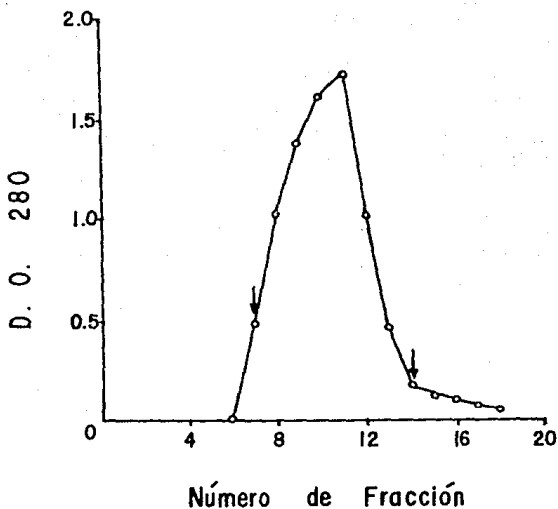


Fig. 1. Cromatografía en DE-52 de una fracción enriquecida en gammaglobulinas de conejo obtenida por precipitación con sulfato de amonio. La muestra se eluyó con amortiguador de fosfatos 0.0175 M, pH 6.9. Las flechas indican el grupo de fracciones seleccionadas.

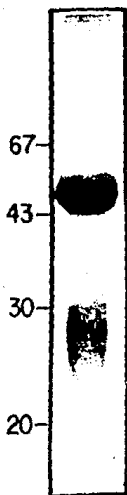


Fig. 2. Electroforesis en un gel de 10% de poli(acrilamida-DSS de la IgG de conejo purificada por DE-52. Cien microgramos de muestra se redujeron con 2-mercaptoetanol antes de la electroforesis. Los pesos moleculares de los marcadores ( $\times 10^5$ ) se indican a la izquierda.

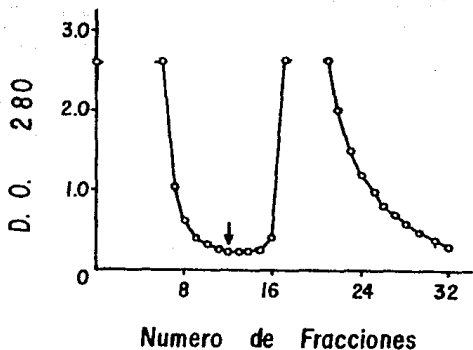


Fig. 3. Purificación de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo por cromatografía de afinidad. El inmunoadsorbente consistió en IgG de conejo acoplada a Sepharosa-4B. La flecha indica el punto en que se agregó el amortiguador glicina-HCl, pH 2.5 para iniciar la elución de los anticuerpos anti-IgG de conejo. Las fracciones 17-24 se juntaron y se concentraron con Aquacide II.

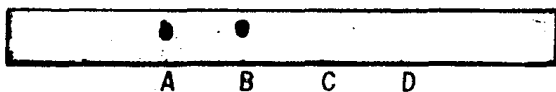


Fig. 4. Evaluación del conjugado GARFc-PX por inmunopunto. Los puntos A, B, C y D contienen 200, 100, 2 y 0.2 ng de IgG de conejo adsorbidos a la nitrocelulosa. La tira se incubó con el GARFc-Px diluido 1:4,000 durante 2.5 h y se reveló por 20 min con ortocloronaftol.



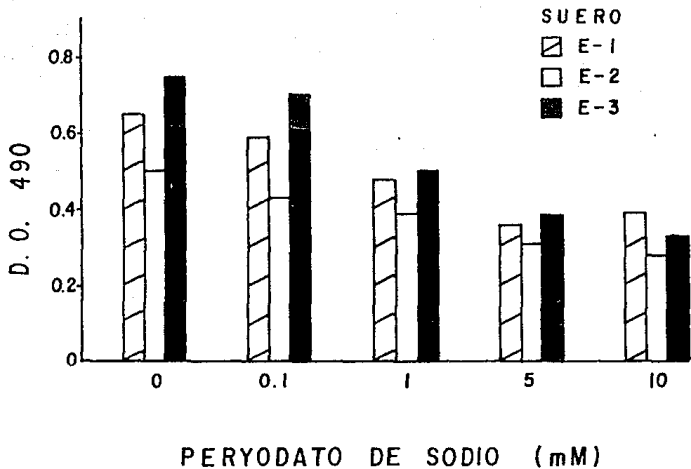


Fig. 5. Efecto del peryodato sobre la reacción del antígeno membranaral de *E. histolytica* con los sueros inmunes de conejo. Las placas de ELISA recubiertas con antígeno se trataron con peryodato a las concentraciones indicadas por 1 h antes de la reacción con el suero inmune.



Fig. 6. Electroforesis de antígenos solubles (carril A) y membranales (carril B) de *E. histolytica* en un gel de 10% de poliacrilamida-DSS (100  $\mu$ g de proteína/carril). Las muestras en cada carril se redujeron con 2-mercaptoetanol antes de la electroforesis y el gel se tiñó con Azul de Coomassie.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

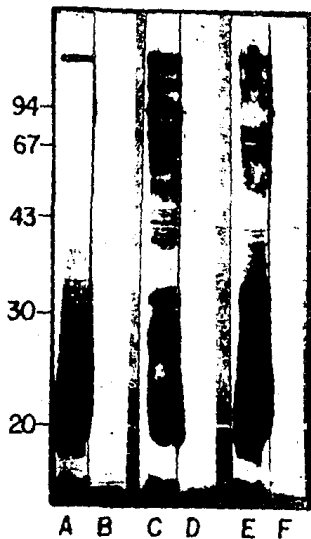


Fig. 7. Inmunoelectrotransferencia de antígenos de E. histolytica. Cien µg de antígeno membranal (A, C y E) y 100 µg de antígeno soluble (B, D. y F), se redujeron y se separaron por electroforesis antes de transferirse a papel de nitrocelulosa. Los pares de tiras A y B, C y D, E y F se trataron con los sueros inmunes E-1, E-2 y E-3 (dilución 1:2,500) respectivamente.

A

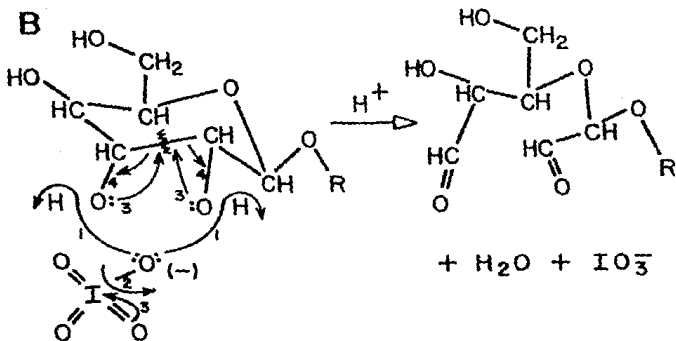
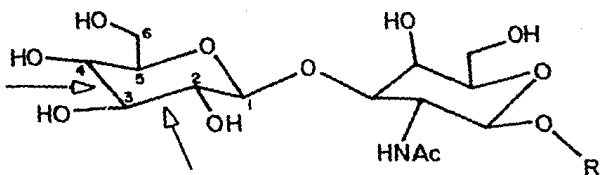


Fig. 11. A) Muestra un azúcar reductor terminal de un oligosacárido. Las flechas indican los sitios vulnerables a la oxidación por el peryodato cuando el carbono 3 no tiene sustituido su hidroxilo.

B) Indica los eventos que se efectúan durante la reacción de oxidación de los grupos de hidroxilo a aldehído causando el rompimiento de la hexosa.

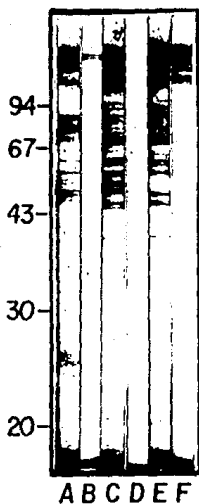


Fig. 9. Electroimmunotransferencia de antígenos solubles de E. histolytica. Las tiras A, C y E se incubaron con una dilución 1:1,000 de los sueros E-1, E-2 y E-3 respectivamente. En B, D y F los sueros se usaron a una dilución 1:5,000.

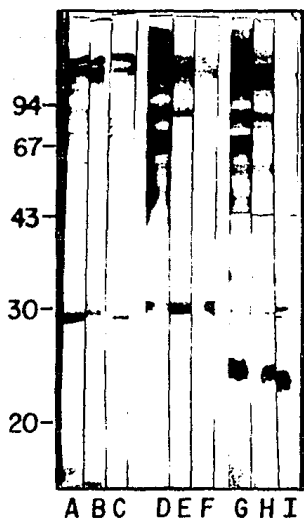


Fig. 10. Efecto del peryodato en el reconocimiento de antígenos membranales de E. histolytica electrotransferidos a nitrocelulosa. Las tiras B, E y H se trataron con solución 10 mM de peryodato a pH 4.2. Las tiras C, F e I se trataron con solución 20 mM de peryodato. Las tiras A, D y G no fueron tratadas con peryodato. Los sueros anti-E. histolytica se usaron a una dilución 1:2,500. Los grupos de tiras ABC, DEF y GHI se incubaron con los sueros E-1, E-2 y E-3 respectivamente.

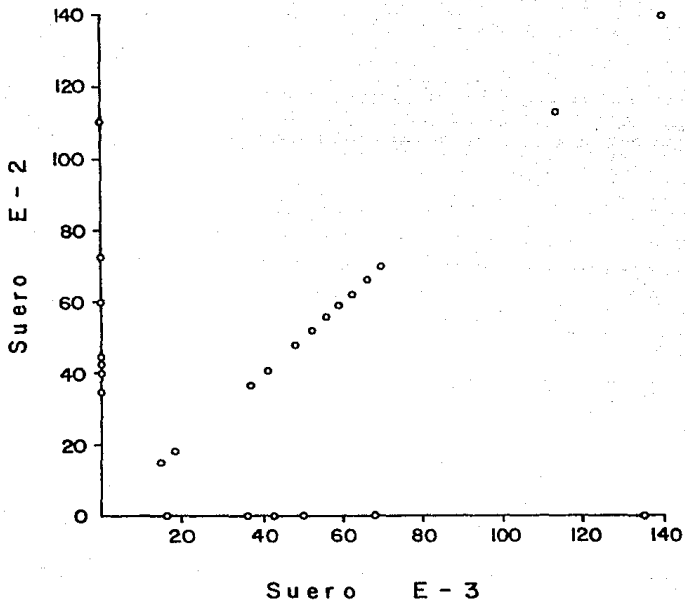


Fig. 8. Análisis gráfico de los resultados de la Inmunolectrotransferencia de la Fig. 7. Los puntos en la diagonal representan las bandas comunes reconocidas por los sueros E-2 y E-3, mientras que los puntos sobre el eje X y Y representan las bandas reconocidas por los sueros E-3 y E-2 respectivamente. La escala de los ejes representa el peso molecular  $\times 10^3$  de las bandas.

## BIBLIOGRAFIA

1. Landa, L., Aubanel, M., Segovia, E., Sepúlveda, B. "Seroepidemiología de la amebiasis en adultos". Arch Invest Med. Supl 2. 377-80. (1972).
2. Walsh, J.A., Warren, K.S., Mahmoud, A.A.F. "Estimating the burden of illness in the tropics". TROPICAL AND GEOGRAPHICAL MEDICINE. Mc Graw-Hill N.Y. (1984).
3. Walsh, J.A. "Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality" Rev Infect Dis. 8. 228-38 (1986).
4. McConnachie, E.W. "The morphology, formation and development of cysts of Entamoeba". Parasitology 59. 41-53 (1969).
5. Boss, H.J. van de Griend, R.J., "Virulence and toxicity of axenic Entamoeba histolytica". Nature 265:341 (1977).
6. Godínez, C., Quijano, M., Jurado, J., Hernández, F. y Álvarez-Cordero, R. "Tratamiento quirúrgico de la colitis amebiana fulminante". Arch Invest. Med. Supl. 1. 237 (1970).
7. Cervantes, F.L., Sánchez, M.E., Santillán, J.M. y Martínez, M.C. "Tratamiento médico del ameboma del ciego y colon ascendente". Arch Inves Med Supl. 2. 427 (1971).
8. Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Leadholt, C.B., Pittman, F.E. "Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated Entamoeba histolytica". Am J Trop Med Hyg. 27. 248-54 (1978).
9. Trissl, D., Martínez-Palomo, A., De la Torre, M., De la Hoz, R., Pérez de Suárez, E. "Surface properties of Entamoeba: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strain". J Exp Med. 148. 1137-45 (1978).
10. Mattern, C.F.I., Keister, D.B., Gaspar, P.A. "Experimental amebiasis. III a rapid in vitro assay for virulence of Entamoeba histolytica". Am J Trop Med Hyg. 27. 882-7 (1978b).
11. Diamond, L.S. "Amebiasis: nutritional implication". Rev Infect Dis. 4. 843-50 (1982).
12. Diamond, L.S., Mattern, C.F.T., Bartig, I.L. "Viruses of Entamoeba histolytica. Identification of transmissible virus-like agents". J Virol 9. 326-41 (1972).



13. Trissl, D., Martínez-Palomo, A., Argüello, C., De la Torre, M., De la Hoz, R. "Surface properties related to Concanavalina A- induced agglutination". J Exp Med 145. 652-65 (1977).
14. Gadasi, H., Kessler, E. "Correlation of virulence and collagenolytic activity in Entamoeba histolytica". Infected Immun 39. 528-31 (1983).
15. Mc Gowan, K., Demeko, C.F., Thorne, G.M., Gorbach, S.L. "Entamoeba histolytica: purification, characterization, strain virulence and protease activity". J Infect Dis 146. 616-25 (1982).
16. Sargeant, P.G., Williams, J.E., Bhojnoni, R., Kumate, J., Jiménez, E. "A review of isoenzymes characterization of Entamoeba histolytica with particular reference to pathogenic and nonpathogenic stocks isolated in México". Arch Invest Med 3 S 13. 89-94 (1982b).
17. Meza, I., De la Garza, M., Meráz-Ríos, M., Gallugos, B., De la Torre, M., Tanimoto, M., Martínez-Palomo, A. "Isoenzyme patterns of Entamoeba histolytica isolated from asymptomatic carrier". Am J Trop Med Hyg 35. 1134-1139 (1986).
18. Kobiler, D., Mirelman, D., "Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites". Infect Immun 29. 221-25 (1980).
19. Young, J.D.E., Young, T.M., Lu, L.P., Unkeless, J.C. Cohn, Z.A. "Characterization of a membrana pore-forming protein from Entamoeba histolytica". J Exp Med 156. 1677-90 (1982).
20. Diamantstein, T., Klos, M., Gold, D., Hahn, H. "Interaction between Entamoeba histolytica and the immune system. I-mitogenicity of Entamoeba histolytica extracts for human peripheral T lymphocytes". J. Immunol. 126. 2084-6 (1981).
21. Gharidian, E., Meerovitch, E. "Effect of immunosuppression on the size and metastasis of amebic liver abscess in hamsters" Parasite Immunol. 3. 329, (1981a).
22. Trissl, D. "Immunology of Entamoeba histolytica human and animal host". Rev Infect Dis 4. 1154-84 (1982).
23. Aust-Kettis, A., Thorstensson, R., Utler, G. "Antigenicity of Entamoeba histolytica strain NIH-200: a suvery of clinically relevant antigenic components" Am J Trop Med Hyg 32. 512-22 (1983).
24. Parkhouse, M., Cid, M.E., Calderón, J. "Identificación de antígenos de membrana de Entamoeba histolytica con anticuerpos de pacientes de amibiasis". Arch Invest Med Suppl. 1. 9, 211-18 (1978).

25. Ortiz-Ortiz, L., Capin, R., Capin, N.R., Sepúlveda, B., Zamacona, G. "Activation of the alternative pathway of complement by Entamoeba histolytica". Clin Exp Immunol **34**. 10-18 (1978).
26. Salata, R.A., Pearson, R.P., Ravdin, J.I. "The interaction of human and Entamoeba histolytica: killing of virulent amebae by activated macrophage". J. Clin Invest **76**. 491-9 (1985).
27. Ghadirian, E., Meerovitch, E., Hartman, D.P. "Protection against amebic liver absces in hamsters by means of immunization with amebic antigen and some of its fractions". Am J Trop Med Hyg **29**. 779-84 (1980).
28. Mitchell, G.F., "Toward molecular vaccines against parasites". Parasite Immunology. **6**. 493-98 (1984).
- 28a. Sepúlveda, B., "Amebiasis: Host-Pathogen Biology". Reviews of Infectious Diseases. **4**. 1247-1253 (1982).
- 28b. Lushbaugh, W.B., "Proteinases of Entamoeba histolytica" in AMEBIASIS HUMAN INFECTION BY Entamoeba histolytica. Edited by Jonathan, I., Ravdin, M.D., Wiley Medical Publication N.Y. (1987).
- 28c. Hobart, M.J., McConnell, I. THE IMMUNE SYSTEM. Blackwell Scientific Publications. Oxford London (1975).
29. Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C. "A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba". Tr Roy Soc Trop Med Hyg. **72** 431 (1978).
30. Aley, S.B., Scott, W.A., Cohn, Z.A. "Plasma membrane of Entamoeba histolytica". J Exp Med **152**. 391-404 (1980).
31. Stanworth, D.R., Turner, M.W. "Immunochemical analysis of human and rabbit immunoglobulins and their subunits". Handbook of Experimental Immunology. IMMUNOCHEMISTRY. Tomo **I**. 13.1-13.13 (1986).
32. James, K., Stanworth, D.R. "Studies on the chromatography of human serum proteins diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose. (1) The effect of the chemical and physical nature of the exchanger". J Chromatog **15**. 324 (1964).
33. Axén, R., Porath, J., Ernback, S. "Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides". Nature **214**. 1302-04 (1967).
34. Lowe, C.R., Dean P.D.G., AFFINITY CHROMATOGRAPHY. p12 Wiley London (1974).

35. Avrameas, S., Ternyck, T. "Acoplamiento de la peroxidasa a los anticuerpos anti-IgG". IMMUNOCHEMISTRY, 8. 1175 (1971).
36. Voller, A., Bidwell, D., Bartlett, A. "The enzyme linked immunosorbent assay, ELISA". Guernsey Great Britain: Dynatech Europe (1979).
37. Hawkes, R. "The dot immunobinding assay". Meth Enzymol. 121. 484-91 (1987).
38. Heyderman, E., Strudley, I., Richardson, T.C. "Chromogens for horse-radish peroxidase" Handbook of Experimental Immunology IMMUNOCHEMISTRY Tomo 4 pag. 129.7 (1986).
39. Woodward, M.P., Young, W.W., Bloodgood, R.A. "Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation". J Immunol Methods 78. 143-153 (1985).
40. Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage". T Nature 227. 680-5, (1970).
41. Towbin, H., Stachelin, T., Gordon, J. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and applications". Proc Natl Acad Sci USA. 76 4350-54 (1979).
42. Bradford, M.M. "A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Anal Biochem 72. 248-54 (1976).
43. Roberts, J.D., Caserio, M.C. ORGANIC CHEMISTRY. Ed. W.A. Benjamin, Inc New York. Amsterdam pg 627 (1965).