

24/201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

ELIMINACION DE PROTEINAS
ABSORBIDAS EN LA MEMBRANA DE
Entamoeba histolytica.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
JUAN MELCHOR IBARRA PACHECO



V. N. A. M.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.	i
LISTA DE FIGURAS	u
RESUMEN	w
I INTRODUCCION.	1
II GENERALIDADES	5
2.1 Historia de la amibiasis	5
2.2 Clasificación taxonómica	7
2.3 Ciclo de vida	9
2.4 Morfología	11
2.5 Factores predisponentes a la amibiasis	13
2.6 Patología de la amibiasis	16
2.7 Respuesta inmune en la amibiasis	25
2.8 Diagnóstico	32
III OBJETIVOS	37
IV DESARROLLO EXPERIMENTAL.	38
4.1 Cultivo y cosecha de trofozoítos de amiba. 38	
4.2 Obtención de membranas de <u>E. histolytica</u> .39	
4.3 Determinación de proteínas.	40
4.4 Tratamiento de membranas de amiba.	41
4.5 Obtención de antisueros	42
4.6 Precipitación de inmunoglobulinas de conejo.	44
4.7 Purificación de inmunoglobulinas de conejo por	

cromatografía de intercambio iónico.	46
4.7.1 Activación de DEAE-celulosa.	46
4.7.2 Purificación de Ig's	47
4.8 Obtención de anticuerpos de caprino anti-IgG de conejo por cromatografía de afinidad . . .	47
4.8.1 Conjugación de IgG de conejo a sepharosa.	47
4.8.2 Purificación de anticuerpos anti- IgG de conejo por columna de IgG de conejo-sepharosa	49
4.9 Conjugación de anticuerpos de caprino anti-IgG de conejo a Peroxidasa	49
4.10 Ensayo inmunoenzimático	50
V RESULTADOS	53
5.1 Tratamiento de las membranas de amiba . . .	53
5.2 Ensayo inmunoenzimático	56
VI DISCUSION.	65
VII CONCLUSIONES.	71
APENDICE	72
A. Reactivos usados.	72
B. Preparación de soluciones	73
VIII BIBLIOGRAFIA	84

LISTA DE ABREVIATURAS

AHA	Absceso neoplásico amibiano.
BCG	Bacilo de Calmetre y Guerin.
CD4	Receptor en linfocito T cooperador.
CDB	Receptor en linfocito T citotóxico/supresor.
Con A	Concanavalina A.
conc.	Concentración.
DEAE	Diethylaminoetil.
D.O.	Densidad Optica.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida. (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).
g	Gravedad fuerza de
GalNac	N-acetil-D-galactosamina.
GlucNac	N-acetil-D-glucosamina.
pHMB	p-Hidroximercuribenzoato.
Ig's	Inmunoglobulinas.
IgA	Inmunoglobulina A.
IgAs	Inmunoglobulina A secretoria.
IgE	Inmunoglobulina E.
IgG	Inmunoglobulina G.
IgG2	Inmunoglobulina G subclase 2.
IgM	Inmunoglobulina M.
KDa	Kilodalton.
M	Molaridad.
ug	microgramo.
ul	microlitro.
mM	milimolar.
um	micrómetro.
N	Normalidad.
nm	nanómetro.
OP	o-fenilendiamina.
PBS	Buffer fosfatos 17.5 mM pH 7.0 NaCl 0.15 M.
PBS-A	Buffer fosfatos 17.5 mM pH 7.0 NaCl 0.175 M.
PBS-T	Buffer fosfatos 17.5 mM pH 7.0 NaCl 0.15 M Tween 20 al 0.05%.
PHA	Fitoheماغلутinina.
F.M.	Peso Molecular.
PMN	Polimorfonuclear.
RIA	Radioinmunoensayo.
SAS	Solución saturada de sulfato de amonio
T.A.	Temperatura ambiente.
TYI-S-33	Tripticasa-Extracto de levadura-Hierro-Suero.

LISTA DE FIGURAS.

Fig. 1. Tratamiento de las membranas de Entamoeba histolytica en agentes caotrópicos.

Gráfica 1. Porcentaje de proteínas amebianas recuperadas después del tratamiento con diferentes agentes caotrópicos: A) control en PBS; B) buffer hipotónico; C) buffer citrato-iodato 12.5 mM pH 3.8 NaCl 0.5 M; D) ácido acético 0.1 M NaCl 0.5 M; E) ácido acético 0.1 M NaCl 3.0 M; F) clorhidrato de guanidina 2.0 M; G) buffer carbonato 0.1 M pH 7.5.

Fig. 2. Esquema de inmunización de conejos para obtener antisueros contra suero bovino y extracto total de ameba.

Fig. 3. Elisa para la detección de proteínas contaminantes en las membranas de ameba tratadas con agentes caotrópicos.

Fig. 4. ELISA para detectar proteínas absorbidas en las membranas de ameba después del tratamiento en ácido acético 0.1 M NaCl 0.5 M. Antígenos: A) suero bovino; B) extracto total de ameba; C) membranas internas sin tratar; D) membranas tratadas en ácido acético 0.1 M NaCl 0.5 M. Sueros de conejo: 1) preinmune; 2) anti-suero bovino; 3) anti-ameba.

Fig. 5. Detección de proteínas absorbidas en la membrana de ameba después del tratamiento con varios agentes caotrópicos. Antígenos: A) suero bovino; B) extracto total de ameba; C) membranas internas no tratadas; D) Membranas tratadas con Clorhidrato de guanidina 2.0 M; E) ácido acético 0.1 M; F) urea 2.0 M; G) NaCl 3.0 M. Sueros de conejo: 1) preinmune; 2) anti-suero bovino; 3) anti-ameba.

Fig. 6. Detección de proteínas contaminantes en las membranas de *E. histolytica* tratadas con diferentes agentes caotrópicos. Antígenos: A) suero bovino; B) extracto total de amiba; C) membranas internas sin tratar; D) Clorhidrato de guanidina 1.0 M; E) NaCl 5.0 M; F) Clorhidrato de guanidina 4.0 M; G) buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5. Sueros de conejo: 1) preimmune; 2) anti-suero bovino; y 3) anti-amiba.

Fig. 7. ELISA para las membranas tratadas sucesivamente con ácido acético 0.1 M NaCl 0.5 M/clorhidrato de guanidina 2.0 M (D). Antígenos: A) suero bovino; B) extracto total de amiba; C) membranas internas sin tratar; D) con ácido acético 0.1 M-NaCl 0.5 M/guanidina 2.0 M. Sueros de conejo: 1) preimmune; 2) anti-suero bovino; 3) anti-amiba.

Fig. 8 I. Detección de proteínas absorbidas en la membrana de amiba después de un tratamiento combinado de guanidina 1.0 M con guanidina 4.0 M (C), y buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5 con guanidina 4.0 M (D).

II. Efectividad de los agentes caotrópicos durante el tratamiento de las membranas internas de amiba. Un ciclo de congelamiento-descongelamiento en guanidina 4.0 M (E), y buffer carbonatos (F). Con dos ciclos de congelamiento-descongelamiento en guanidina 4.0 M (G), y con buffer carbonatos (H). Antígenos: A) suero bovino; B) membranas internas sin tratar. Sueros de conejo: 1) preimmune; 2) anti-suero bovino; 3) anti-amiba.

RESUMEN

La finalidad de este trabajo fue el de eliminar las proteínas de suero bovino absorbidas en las membranas de amiba por un tratamiento de congelamiento-descongelamiento en agentes caotrópicos. Además de monitorear la exclusión de los contaminantes por el empleo de un ensayo inmunoenzimático en fase sólida [ELISA]. Los resultados muestran que después del tratamiento en agentes caotrópicos los rendimientos de membranas tratadas se reduce en un 23 %. La exclusión de los contaminantes sericos no fue total, pero si hubo una reducción notable de las proteínas de suero bovino presentes en las membranas tratadas con los agentes caotrópicos. De todos ellos, el que parece elimina una gran cantidad de contaminantes fue el sistema combinado de Ácido acético 0.1 M NaCl 0.5 M con Clorhidrato de guanidina 2.0 M. Estas membranas tratadas pueden ser útiles como inmunógenos para obtener sueros anti-amiba sin la presencia de anticuerpos contra los contaminantes de suero bovino acarreados por las membranas purificadas de la amiba.

I INTRODUCCION.

A principios de la década de los sesentas, Diamond (26) logró con éxito el cultivo axénico, es decir libre de bacterias, del parásito E. histolytica. Desde entonces, el medio axénico se ha empleado para la investigación de la biología celular, fisiología, patogenicidad, inmunología y evaluación de fármacos in vitro contra el parásito (110). Además del desarrollo de nuevas técnicas serológicas y la aplicación de otras ya conocidas para el diagnóstico de la enfermedad (44). Todo ello ha redituado en una mejor comprensión de la patogénesis de la infección, que es un importante problema de salud pública, sobre todo en los países subdesarrollados como México (139).

Ahora bien, el interés actual de muchos investigadores es el de caracterizar las proteínas inmunogénicas amibianas, que interaccionan con el sistema inmune del hospedero. Estos estudios se han realizado con el uso de extractos completos o solubles de amibas cultivadas axénicamente. La identificación de los antígenos amibianos se ha hecho principalmente por cromatografía de exclusión (3,11,57), inmunoelectroforesis (38), inmunoelectroforesis bidimensional (25) y recientemente por Western blot (50), en el que también se ha usado como antígeno las membranas plasmáticas del parásito (64,76). Otro método es la identificación de las proteínas amibianas con sueros anticámbia obtenidos de animales inmunizados con trofozoitos viables o fracciones de los mismos, produciendo

antisueros específicos contra los determinantes antigénicos del parásito (10,24,99).

Sin embargo, el cultivo axénico de *E. histolytica* requiere la presencia de suero de mamíferos; el más utilizado es el suero bovino. Las proteínas de este suero se adhieren al parásito cultivado in vitro (64), además de ser pinocitadas y fagocitadas por la ameba del medio (34), de tal forma que se encuentra en los trofozoítos empleados como inmunógenos (35,64). Los antisueros resultantes, obtenidos de animales inmunizados con extractos amebianos del cultivo axénico, contienen anticuerpos contra las proteínas del suero bovino (25,133); el medio de cultivo en sí no contiene proteínas que puedan representar un serio obstáculo en la investigación e inmunodiagnóstico de la amibiasis invasiva (104).

Tales contaminantes se han tratado de eliminar de la superficie del parásito por lavados repetidos (49,121) antes de la preparación de los antígenos amebianos. A pesar de los lavados exhaustivos, que repercuten en el rendimiento del antígeno obtenido, los contaminantes adheridos disminuyen en gran proporción pero no son eliminados completamente (34). Otra alternativa es el tratar de quitar los anticuerpos indeseables de los antisueros de los animales inmunizados con amebas contaminadas con proteínas del suero bovino. Un método que se ha usado es el pasar los antisueros por columnas de afinidad, que contienen gel conjugado a proteínas del suero bovino, resultando en un suero sin anticuerpos contra las proteí-

nas séricas (77, 101). En nuestra experiencia, este método tiene el inconveniente de que en los sueros "purificados" aún persisten los anticuerpos indeseables y se diluye mucho el suero.

Tales anticuerpos contaminantes pueden dar una reacción cruzada con los componentes séricos del suero humano, sobre todo con la albúmina sérica y las gammaglobulinas (51, 101). Esta reactividad cruzada es el principal obstáculo para usar sueros anti-amiba de animales experimentalmente inmunizados en técnicas como el radioinmunoensayo en fase sólida (101, 102), ELISA de tipo sandwich (33, 77, 151), que son las más empleadas actualmente en la búsqueda de complejos inmunes de anticuerpo-amiba en los sueros de pacientes con AHA

(33, 77, 101, 102, 151). Técnica que consiste en colocar el anticuerpo captor anti-amiba en la fase sólida, al cual capta al antígeno amibiano que está unido al anticuerpo humano en el complejo inmune, y este mismo antígeno es detectado por otro anticuerpo anti-amiba de diferente especie al anticuerpo captor.

Por lo tanto, el presente estudio se enfoca a eliminar las proteínas del medio de cultivo absorbidas a la membrana de los trofozoítos de E. histolytica, tratando las membranas por congelamiento-descongelamiento en agentes caotrópicos. De esta manera se obtendrá antígeno amibiano purificado, útil como inmunógeno para la producción de sueros anti-amiba libre de anticuerpos anti-proteínas del suero bovino. Estos sueros

serán eficaces para la identificación de los antígenos propios de la superficie amibiana y en los métodos inmunológicos aplicados en la investigación del parásito y al diagnóstico de la enfermedad.

II GENERALIDADES.

2.1 Historia.

Los padecimientos intestinales en el hombre, como la disentería, han sido mencionados en viejos documentos médicos de chinos, hebreos y griegos. Algunos de estos padecimientos podrían ahora interpretarse como casos de amibiasis. Por ejemplo, se mencionan casos de diarrea mucosanguinolenta con fiebre, en el documento de Sanskrit conocido como "BRIGUSAMHITA" escrito 3000 años A.C. (73) ., e Hipócrates en el siglo V A.C. describe por vez primera la enfermedad ulcerativa del intestino (110). No es sino en 1828 por Annesley quién hace una descripción de la disentería, reconociendo una relación entre la infección intestinal y el mal hepático (110).

En 1859, Lambl descubrió en un niño de Praga, quién murió de un cuadro diarréico, la presencia de un protozooario con pseudópodos, al cual no le dio importancia y pronto fue olvidado. El verdadero descubridor del agente etiológico de la amibiasis, fue el doctor Fedor Alekan Lösch [Lesh], en un paciente ruso en San Petesburgo hoy Leningrado en 1875, que padecía de disentería. Realizando análisis microscópicos de las evacuaciones del paciente, descubrió unas células de forma móvil y rápidamente se reconocieron como parásitos animales, esto es, como amibas. Lesh las comparó en características morfológicas con algunas especies de amibas conocidas y concluyó que era una especie no conocida y la

nombró como Amoeba coli (73).

Entre 1885-1887, Kartulis demostró la presencia de amibas en 150 casos de disentería, a él se le considera como el primero en afirmar que la amiba era el agente etiológico y que los abscesos hepáticos encontrados en algunos casos eran secuela de la misma enfermedad (73). En 1691 Councilman y Lafleur confirman el papel patológico de las amibas y crean los terminos de "disenteria amibiana" y de "absceso hepático amibiano", además de proponer el nombre al agente causante de Amoeba dysintereae. Ellos también encuentran especies no patógenas en el intestino humano (73).

En 1903 Quink y Roos, descubren la forma de quiste de la disentería amibiana y su papel en la diseminación del parásito (73). Las características de las formas de quiste de dos especies similares que frecuentemente se encuentran en el intestino humano, fueron cuidadosamente descritos por Huber en 1903, y en ese mismo año Schaudinn fue quién definió las características estructurales de las formas vegetativas, y dió a las especies patógenas el nombre técnico de Entamoeba histolytica, aún usado hasta ahora, y a las especies no patógenas el nombre de Entamoeba coli (110).

En 1913 Musgrave y Clegg crean el término de "amibiasis" para demostrar una infección por E. histolytica, sin hacer caso de si esta condición está o no acompañada por síntomas (73). Otros investigadores, Walker y Sellards demuestran la patogenicidad del parásito amibiano, suministraron quistes de E.

histolytica y quistes de E. coli a un grupo de voluntarios sanos. Como resultado obtuvieron la disentería amibiana en aquel grupo de personas que ingirieron quistes de E. histolytica (158).

Es en 1914 cuando se inician los trabajos inmunológicos preparanuo antígenos acuosos de E. histolytica a partir de materia fecal, obteniendose reacciones positivas para la fijación de complemento (158). En 1924, Boek y Drboniav logran cultivar con éxito a E. histolytica, en un medio artificial a base de yema de huevo que contiene la flora microbiana de la materia fecal. Con este tipo de cultivo Craig en 1927, prepara un antígeno para la fijación de complemento. Es hasta 1961 cuando Louis Diamond (26), obtiene por primera vez un cultivo axénico, es decir libre de bacterias, el cual ha servido para preparar antígenos libres de microorganismos. Y tan pronto como se obtuvieron cultivos en masa de diferentes cepas de E. histolytica, se han desarrollado estudios de la fisiología, patogenicidad e inmunología de la amibiasis (14).

2.2 Clasificación taxonómica.

Las amibas parásitas del hombre se agrupan en el subreino Protozoa, phylum Matigospora, subphylum Sarcodina, familia Endamoebidae, que a su vez se divide en los géneros Entamoeba, Iodamoeba, Endolimax y Vientamoeba (85). Siendo de interés para el hombre los protozoarios que pertenecen al primer género. En el grupo de Entamoeba, las

amibas se clasifican en base al número de nucleos en el quiste maduro. Así tenemos, en el grupo de los quistes uninucleados a Entamoeba polecki, clasificadas por Von Prowazek 1912, parásito común en cerdos pero ocasionalmente encontrado en el hombre; en los quistes tetranucleados se encuentran dos especies, una es Entamoeba histolytica, Schaudinn 1903, y la otra es Entamoeba hartmanni, Von Prowazek 1912; en el grupo de los quistes octanucleados se tiene a Entamoeba coli, Hickson 1909; y por último el cuarto grupo formado por una sola especie que es Entamoeba gingivalis, Smith y Barret 1914, a la cual no se le conocen formas quísticas. De todas las especies de Entamoeba la causante de enfermedad importante en el hombre es Entamoeba histolytica (73.110).

E. histolytica está compuesta de un número no conocido de cepas que pueden actuar como comensales en el lumen intestinal (estado de portador) o como formas patógenas que producen ulceraciones en el intestino grueso y manifestaciones de síntomas (amibiasis invasiva). Sargeant y colaboradores (135) han analizado el patrón isoenzimático de diferentes aislamientos de E. histolytica buscando pequeñas diferencias entre cuatro enzimas del metabolismo glucolítico de la amiba. Dicha técnica se basa en las diferencias del punto isoelectrico de la enzima a examinar. Estos catalizadores pueden servir como marcadores de cepas aunque no tienen relación con la patogenicidad del parásito. Se obtuvieron los

siguientes resultados: de diferentes cepas obtenidas de diversas partes del mundo: todas las especies de Entamoeba presentan diferentes patrones isoenzimáticos (135). Dentro de la especie E. histolytica se han identificado un total de 22 diferentes patrones isoenzimáticos o zimodemos (134). Las cepas patógenas derivadas de pacientes con síntomas de amibiasis invasiva se agrupan en nueve diferentes zimodemos (II, VI, VII, XI-XIV, XIX y XX). Estos zimodemos de cepas patógenas se distinguen por la presencia de una banda beta en ausencia de una banda alfa de la enzima fosfoglucomutasa y por las bandas adelantadas de la hexoquinasa en todo el patrón XIII. Los zimodemos restantes (I, III-V, VIII-X y XV-XVIII) son de amibas aisladas de portadores sanos. Los zimodemos XXI y XXII se obtuvieron por ingeniería genética en el laboratorio (134).

2.3 Ciclo de vida.

El ciclo vital de E. histolytica tiene una forma activa de crecimiento y división (fase de trofozoito) y la otra de diferenciación celular que incluye procesos de enquistamiento y desenquistamiento, siendo esta última forma la que le permite propagarse a otros hospederos (85). Los quistes al ser ingeridos pasan sin cambio a través del estómago y la parte superior del intestino. Los quistes maduros para su exquistación perforan en la pared un orificio extremadamente pequeño por el cual escapa. Una vez emergida se le denomina

amiba metaquistica, la cual se desarrolla y divide dando la formación de cuatro amibas mononucleadas [ameébulas] que se convierten en el trofozoíto ordinario, el cual se divide por fisión binaria dando lugar a amibas hijas. Esta multiplicación se lleva a cabo en el lumen así como en los tejidos intestinales. El enquistamiento es sólo en la luz intestinal. Al iniciar el enquistamiento la forma activa se divide dando lugar a amibas más pequeñas que dejan de nutrirse, libera del citoplasma partículas alimenticias para quedarse con vacuolas llenas de glucógeno y las barras cromatoides. En esta etapa se llama amiba prequistica y es más pequeño que el trofozoíto ordinario, se inmoviliza, redondea y excreta una delgada pared convirtiéndose en un quiste inmaduro con un núcleo el cual continúa su desarrollo hasta los típicos quistes tetra-nucleados. En las heces fecales humanas se pueden encontrar trofozoítos, prequistes y quistes. Sin embargo, las dos primeras formas mueren por la acción de los agentes físicos externos y en caso de ser ingeridos mueren por la acción del jugo gástrico. Solamente el quiste es la forma infectante por vía oral. En el medio externo, los quistes permanecen viables en las condiciones de temperatura y humedad apropiadas por semanas o meses, diseminándose por las manos, agua y alimentos contaminados, completándose así el ciclo del parásito (14, 42, 158).

2.4 Morfología.

Las amibas tienen forma muy heterogénea. En general, son de forma elongada con un pseudópodo protuberante; son activamente móviles. El trofozoíto o forma vegetativa mide de 20 a 60 μm de diámetro (73).

El citoplasma se divide en dos partes, ectoplasma y endoplasma. El primero es hialino y fino, el segundo es granular. La mayor parte del endoplasma parece consistir de vacuolas embebidas en la matriz citoplasmática. Las vacuolas son generalmente esféricas y de tamaño variable de 0.5 a 9.0 μm de diámetro. Ultraestructuralmente se han identificado vacuolas fagocíticas, vacuolas macropinocíticas, vacuolas micronocíticas, "lisosomas primarios", "lisosomas secundarios", cuerpos residuales y vacuolas autofágicas (72).

Otros componentes son los ribosomas, usualmente ordenados en hélices de aproximadamente 300 nm de largo y 40 nm de ancho, que constituyen los clásicos cuerpos cromatoides identificados al microscopio de luz tanto en el trofozoíto como en el quiste; no se han detectado mitocondrias, aparato de Golgi u otros organelos (74).

El citoesqueleto contiene microfilamentos poco densos de 7 nm de diámetro y se localizan inmediatamente debajo de la membrana plasmática, también se han detectado microtúbulos en la forma vegetativa y en el núcleo durante la división nuclear. Además se han identificado y caracterizado la presencia de actina en el trofozoíto amibiano (78).

La membrana plasmática de los trofozoítos es la clásica unidad de membrana, mide 10 nm de ancho, un poco más ancha que la membrana de las células eucarióticas que miden 8 nm (72).

El núcleo de E. histolytica, que ha servido como característica morfológica para identificar las especies del género Entamoeba, en el cual, la distribución de cromatina nuclear difiere de una especie a otra, posee un cariosoma compacto localizado en el centro del núcleo y que contiene DNA y la cromatina distribuida en la parte interna de la membrana nuclear y es rico en RNA (14). E. histolytica puede reconocerse y diferenciarse de las demás especies del género Entamoeba por la distribución de la cromatina en el núcleo que difiere morfológicamente de una especie a otra. El mecanismo de división nuclear no es del todo claro, pero se sabe que se lleva a cabo sin la disolución de la membrana nuclear, seguida de la multiplicación de los trofozoítos por fisión binaria (23).

El ciclo de vida del parásito, se completa con la formación de quistes, que ocurre después de la fisión binaria del trofozoíto. El quiste tiene una forma esférica o ligeramente ovalada de 8 a 20 μ m de diámetro. La pared del quiste mide de 120 a 150 nm de ancho y está compuesta por quitina (110). Al ser vistos al microscopio electrónico de barrido presentan una superficie rugosa uniforme en la cara externa de la membrana quística (73).

2.5 Factores predisponentes a la amibiasis.

La expresión de los mecanismos de patogenicidad [virulencia] de E. histolytica para que invada o no los tejidos, depende de factores tanto del hospedero como del parásito.

Los factores predisponentes del hombre son:

SEXO. El absceso hepático amibiano se presenta más en los hombres que en las mujeres en una proporción de 3:1. Esto puede ser debido más a la exposición al microorganismo que a la susceptibilidad del mismo (6).

EDAD. Los niños son más susceptibles a las formas fulminantes de la amibiasis, pero la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en adultos jóvenes de 22 a 30 años de edad (32,42,73).

HABITAT. Las condiciones de vivienda y carencia de servicios públicos en las poblaciones de áreas endémicas, son los principales factores de la propagación y prevalencia de la amibiasis (139).

DIETA. Una alimentación con deficiencia de proteínas y rica en carbohidratos realza la colonización del intestino de ratas (123). En el hombre una dieta rica en leche parece tener efecto protector (63).

EMBARAZO. Es otro factor predisponente a las formas fulminantes de la amibiasis (42,73).

ESTRESS. Ratas en celo, excitadas o bajo tensión son más susceptibles a la infección (73).

ESTADO INMUNOLÓGICO. La baja de defensas en el hospedero es

debida a una mala nutrición o por un tratamiento inmunosupresor (26).

Los factores por parte del parásito para poder invadir los tejidos del intestino son varios, entre los más importantes están:

ESPECIES Y CEPAS. Existe una especie similar a E. histolytica de menor tamaño conocida anteriormente como "raza pequeña", ahora llamada E. hartmanni, que no tiene capacidad invasora (158). Por métodos isoenzimáticos, ya mencionados, se han encontrado 22 diferentes grupos de E. histolytica, de las cuales nueve tienen actividad invasiva en el hombre, y once son de especies comensales (134). Otra cepa de amiba de origen humano morfológicamente similar a E. histolytica es la llamada cepa "LAREDO", aislada de un paciente con amibiasis recurrente. Es morfológicamente indistinguible de E. histolytica, pero difiere de sus requerimientos de temperatura y crecimiento de cultivo. Es capaz de crecer y colonizar a T.A., así como a 37°C y en soluciones hipotónicas (158). Existen diferencias antigénicas entre la cepa Laredo y E. histolytica que permite distinguirlas a pesar de ser especies estructuralmente similares (38).

MECANISMOS DE EVASION. Se han propuesto varios mecanismos de evasión de E. histolytica del sistema inmune del hospedero. Tales como el posible enmascaramiento de los epitopos del parásito con material del medio ambiente (34,34). La redistribución del anticuerpo unido al antígeno de membrana, que

lleva a la formación del encasquetamiento ("CAP"), que es internalizado o excretado al exterior (12,17,81,69,103), evitando la lisis por complemento (147). La pérdida de susceptibilidad al sistema complemento (15,20), y la inducción de un estado inmunosupresor de la inmunidad celular del hospedero (36).

ENZIMAS. En E. histolytica, se han detectado enzimas con actividad proteolítica que pueden participar en el mecanismo patogénico de la amiba sobre el epitelio intestinal. La principal clase de proteasas encontradas en el parásito son las thiol-dependientes, es decir, cisteinproteinasas (13,96). Dentro de las cisteinproteasas se han detectado diferentes enzimas tales como una enzima semejante a la Cathepsina B de mamíferos con un PM de 16 KDa y activa a pH 5.0 (66), una proteasa débilmente ácida con poderosa actividad proteolítica de PM de 21 KDa (137), una enzima principal neutra soluble de PM de 56 KDa (53), una histolisina estable a pH básico con fuerte actividad proteolítica y PM de 29 KDa (67). Otra enzima detectada es una collagenasa (82,138).

Estudios recientes indican que hay cinco enzimas del tipo cisteinproteasas con PM de 73, 45, 36, 30, y 23 KDa, de las cuales la de PM de 73 KDa se localiza en la fracción soluble del extracto amibiano y el resto se encuentran formando parte de las membranas internas y plasmáticas de la amiba (95). in vitro estas cisteinproteasas son las primeras responsables de la necrosis tisular del tejido epitelial en ratas, pero no

del proceso inflamatorio (15).

2.6 Patología de la amibiasis.

El comité experto en la amibiasis de la Organización Mundial de la Salud [OMS, 1969] (157), definió esta enfermedad como la condición de portador del parásito E. histolytica con o sin manifestaciones clínicas. Clasificándola como asintomática, esto es sin manifestación de la infección, y sintomática que son la amibiasis intestinal y la amibiasis extraintestinal (75).

Amibiasis intestinal.

La patología básica de la amibiasis intestinales la destrucción del epitelio e invasión de la pared intestinal por el parásito (85). Las lesiones iniciales se presentan en cualquier parte del intestino grueso, especialmente en el colon. Las ulceraciones predominan en la región ileocecal, sigmoides y recto (14,42,158).

Aún no se conoce el mecanismo por el cual E. histolytica invade y penetra el epitelio (14,74). En la amibiasis intestinal humana así como en la experimental, la invasión de la mucosa intestinal comienza en el epitelio interglandular, un sitio de baja resistencia donde normalmente tiene lugar el desecho de las células intestinales como etapa final de la constante renovación del epitelio (74).

Pueden ser uno o varios los puntos de penetración, las lesiones están confinadas a la mucosa y tienden a ampliarse

lateralmente. La lesión inicial es microscópica con un orificio central y rodeado de hiperemia y edema con material necrótico y abundantes trofozoítos en el interior. La mucosa generalmente observada entre las lesiones es normal (14). Al progresar la invasión las úlceras crecen tanto en dirección horizontal como en profundidad, con un pequeño orificio de entrada y constituyen los clásicos "ojales de camisa". Se producen grandes áreas de necrosis de la mucosa, en la muscularis mucosa y ocasionalmente en la capa serosa, con perforación de la cavidad peritoneal. La perforación es generalmente múltiple, siendo la etapa final de la amibiasis intestinal (14,158).

Con la erosión de los vasos sanguíneos intestinales, los trofozoítos pueden ser transportados vía vena porta al hígado donde puede formarse el absceso hepático amibiano; ocasionalmente algunos trofozoítos son transportados por la sangre a los pulmones o cerebro donde colonizan y producen abscesos. Estos últimos casos son raros (14,73).

Prathap y Gilman, describen cinco tipos de lesiones que ordenaron de acuerdo con la severidad de las mismas(107):
LESION INESPECIFICA. que no muestra ulceración pero hay hiperemia glandular y edema estromal. Hay neutrófilos presentes en el estroma y en las células epiteliales. Las amibas ocasionalmente se encuentran en el exudado o embebidas en el moco.

DEPRESION MUCOPENICA CON MICROULCERACION. no hay ulceración

pero sí una depresión superficial pequeña de la mucosa de la superficie y pérdida de células caliciformes. La depresión se acentúa por la manifestación de las características de la lesión inespecífica de la mucosa adyacente. Un gran número de amibas se encuentra en oposición cercana de la depresión de la mucosa.

LESION DE INVASION TEMPRANA CON ULCERACION SUPERFICIAL, que aparece con un pequeño foco interglandular con necrosis mínima de tejido y de respuesta de las células inflamatorias o con grandes áreas de ulceraciones superficiales, donde los agregados amibianos están separados del tejido sobreviviente por una delgada zona de necrosis. Hay tenue infiltración en la lámina propia por neutrófilos y la mucosa muscular está intacta.

ULTIMA LESION INVASIVA CON ULCERACION GRAVE O PROFUNDA, que realmente es la clásica úlcera de matraz o de ojal de camisa. Se caracteriza por la submucosa minada que se extiende en una gran área de la submucosa, que a veces es tan grande que la úlcera excede a la mucosa. Las zonas de necrosis se interconectan a través de la lámina propia por un puente estrecho también de tejido necrótico. Las capas musculares están intactas; una zona eosinofílica de necrosis fibrinóide separa a las amibas del resto de la submucosa.

Por último, LA ULCERA GRANULANTE, que muestra pérdida de la mucosa y submucosa con la formación de tejido granulante. Las amibas no se localizan dentro del tejido, pero se encuen-

tran ocasionalmente en la superficie del exudado.

Más aún, se ha observado que son numerosas las células inflamatorias en las lesiones ulceradas. las células epiteliales están severamente dañadas aún cuando están alejadas de las amibas. En las áreas ulceradas de la lámina propia hay salida de eritrocitos que son fagocitados por las amibas, además de fagocitar neutrófilos, leucocitos, eosinófilos, linfocitos y otras células (99).

Mecanismo citopatogénico.

La invasión de tejidos en la amibiasis intestinal por E. histolytica se lleva a cabo por varios pasos. 1) Adherencia de la amiba a las células blanco, la cual es mediada por adhesinas. 2) Lisis celular dependiente del contacto. Y 3) Fagocitosis de las células blanco que puede ocurrir antes de la lisis dependiente del contacto (109,113). Estos pasos son vitales en la patogenicidad de la amiba (110).

El primer paso, la adherencia, esta mediado por adhesinas amibianas algunas de ellas con afinidad específica a carbohidratos (63). Estas lectinas son inhibidas en su función por N-acetil-D-galactosamina [GalNac] (109,113,116) o residuos de galactosa; otra es inhibida por la N-acetil-D-glucosamina [GluNac] (53,86). Se ha descrito una adhesina amibiana, que aparentemente no reconoce carbohidratos (9).

En una caracterización y análisis de la lectina inhibida por GalNac, se ha demostrado que tiene un PM de 260 KDa. Esta

compuesta por dos cadenas, una pesada de 170 KDa y una ligera de 35 KDa (100). La cadena pesada parece ser la responsable del evento adherente de la ameba a su célula blanco (112). La lectina inhibida por GluNac, recientemente purificada tiene un FM de 220 KDa (122) y participa en la adhesión a eritrocitos humanos y a las células MCDK en cultivo (77,104). La adhesina amebiana, diferente de las anteriores, es una proteína de FM de 112 kDa (9), que participa en la adherencia de la ameba a los eritrocitos, la eritrofagocitosis y efecto citopático en monocapas de cultivo celular (9).

La lisis dependiente del contacto, es el segundo paso del mecanismo patogénico amebiano, es un evento mediado por la adhesión del trofozoito a su célula blanco. Implica una ameba activa, ya que la citolisis se inhibe por disfunción de los microfilamentos a baja temperatura (113).

La ameba tiene dos fosfolipasas A, una dependiente de calcio con actividad óptima a pH 7.5 localizada en la membrana plasmática y la otra independiente de calcio con actividad a pH 4.5 soluble o localizada en las fracciones membranales (65,115). Ravdin (113) propone un mecanismo de lisis en el cual la ameba se adhiere a su blanco por medio de la adhesina inhibible por GalNac y activa la función de los microfilamentos. La fosfolipasa A amebiana [de membrana o soluble] se encarga de liberar las toxinas contenidas en los lisosomas amebianos que destruirán a la célula blanco (89,112).

Por último, las amebas fagocitan la célula blanco (113). La

capacidad fagocítica de E. histolytica, sobre todo de eritrocitos, se ha tomado como una medida del grado de virulencia (63). Los trofozoítos amibianos obtenidos de pacientes con disentería amibiana fagocitan con mayor avidez glóbulos rojos que las cepas obtenidas de portadores sanos (69,148). Además se ha hecho una correlación de la eritrofagocitosis con la virulencia amibiana. Orozco y colaboradores (86) compararon la cepa virulenta HM1-INSS con una clona de E. histolytica deficiente de fagocitosis L-6; la primera endocita un gran número de eritrocitos mientras que la clona es deficiente en fagocitosis. Además la cepa HM-1 produce lesiones hepáticas en el Hamster y la clona L-6 no produjo ninguna lesión (86). Otras características de la clona L-6 son su incapacidad en el ECP, formar colonias en agar semisólido, lo que tal vez puede contribuir a la falta de patogenicidad.

Manifestaciones clínicas.

La presentación de las lesiones de la amibiasis intestinal son bien conocidas como colitis úlcera, megacolon tóxico o disentería amibiana fulminante, ameboma o granuloma amibiano (14,42,158).

La colitis amibiana úlcera aparece en el colon sigmoide y recto. Las lesiones son pequeñas (0.1-0.5 cm), con áreas ligeramente elevadas y redondeadas en la mucosa con centros necróticos irregulares. A menudo son pocas las úlceras y difíciles de detectar, especialmente debido a las diferentes capas de mucosa, que pueden aparecer normales. Pero por otro

lado, pueden aparecer úlceras serpenteantes o más irregulares de 1 a 5 cm de largo. Estas úlceras serpenteantes están localizadas en el cecum y colon ascendente. Tales úlceras serpenteantes son característicamente menos profundas con amplitud y márgenes elevadas. Ambos tipos de úlceras, elevadas y serpenteantes, pueden ser encontradas en el mismo paciente (99).

El megacolon tóxico, es la forma altamente letal de la amibiasis intestinal, conocida como disentería amibiana fulminante, ésta es afortunadamente es rara. Se presenta en personas mal alimentadas y en ancianos o en individuos que viajan de un área no endémica a una endémica. El intestino grueso aparece grandemente distendido, con destrucción masiva de la mayoría de la pared la cual es muy delgada. La perforación, usualmente múltiple, puede presentarse llevando a una peritonitis purulenta aguda. Llega a ocurrir necrosis masiva de la pared del colon y raramente con hemorragia (59,114).

El ameboma o granuloma amibiano tambien, es una forma infectante de la amibiasis intestinal. Aparece más a menudo en el cecum y colon ascendente, es bastante grande (3 a 30 cm), con una masa serosa ocupando la pared el lumen. La mucosa es excesivamente delgada y usualmente ulcerada, mientras que las otras capas de la pared son muy gruesas, edematosas y hemorrágicas. El peritoneo involucrado es irregular. La mucosa intestinal puede ser edematosa y congestionada por la vecindad del ameboma y puede contener úlceras nodulares, las cuales

capacidad fagocítica de E. histolytica, sobre todo de eritrocitos, se ha tomado como una medida del grado de virulencia (85). Los trofozoítos amibianos obtenidos de pacientes con disentería amibiana fagocitan con mayor avidez glóbulos rojos que las cepas obtenidas de portadores sanos (89,148). Además se ha hecho una correlación de la eritrofaagocitosis con la virulencia amibiana. Orozco y colaboradores (86) compararon la cepa virulenta HM1-INS5 con una clona de E. histolytica deficiente de fagocitosis L-6; la primera endocita un gran número de eritrocitos mientras que la clona es deficiente en fagocitosis. Además la cepa HM-1 produce lesiones hepáticas en el Hamster y la clona L-6 no produjo ninguna lesión (86). Otras características de la clona L-6 son su incapacidad en el ECP, formar colonias en agar semisólido, lo que tal vez puede contribuir a la falta de patogenicidad.

Manifestaciones clínicas.

La presentación de las lesiones de la amibiasis intestinal son bien conocidas como colitis ulcerativa, megacolon tóxico o disentería amibiana fulminante, ameboma o granuloma amibiano (14,42,158).

La colitis amibiana ulcerativa aparece en el colon sigmoide y recto. Las lesiones son pequeñas (0.1-0.5 cm), con áreas ligeramente elevadas y redondeadas en la mucosa con centros necróticos irregulares. A menudo son pocas las úlceras y difíciles de detectar, especialmente debido a las diferentes capas de mucosa, que pueden aparecer normales. Pero por otro

lado, pueden aparecer úlcera serpenteantes o más irregulares de 1 a 5 cm de largo. Estas úlceras serpenteantes están localizadas en el cecum y colon ascendente. Tales úlceras serpenteantes son característicamente menos profundas con amplitud y márgenes elevadas. Ambos tipos de úlceras, elevadas y serpenteantes, pueden ser encontradas en el mismo paciente (77).

El megacolon tóxico, es la forma altamente letal de la amibiasis intestinal, conocida como disentería amibiana fulminante, ésta es afortunadamente es rara. Se presenta en personas mal alimentadas y en ancianos o en individuos que viajan de un área no endémica a una endémica. El intestino grueso aparece grandemente distendido, con destrucción masiva de la mayoría de la pared la cual es muy delgada. La perforación, usualmente múltiple, puede presentarse llevando a una peritonitis purulenta aguda. Llega a ocurrir necrosis masiva de la pared del colon y raramente con hemorragia (59,114).

El ameboma o granuloma amibiano también, es una forma infectante de la amibiasis intestinal. Aparece más a menudo en el cecum y colon ascendente, es bastante grande (5 a 30 cm), con una masa serosa ocupando la pared el lumen. La mucosa es excesivamente delgada y usualmente ulcerada, mientras que las otras capas de la pared son muy gruesas, edematosas y hemorrágicas. El peritoneo involucrado es irregular. La mucosa intestinal puede ser edematosa y congestionada por la vecindad del ameboma y puede contener úlceras nodulares, las cuales

son indicativas del diagnóstico. En los casos crónicos el ameboma puede ser localizado y el resto del colon aparecer intacto. Ocasionalmente pueden ser más de un ameboma y en casos raros la mayor parte de la pared puede estar involucrada (14,99,158).

Ambiasis extraintestinales.

La invasión amebiana a otros órganos diferentes al intestino da lugar a tres importantes complicaciones: extensión directa a piel, perforación a la cavidad abdominal y diseminación hematológica.

La extensión directa a piel es poco frecuente y se ha reportado en pacientes con disentería y homosexuales. Se caracteriza por la aparición rápida de una úlcera localizada en el área perianal y perineal, con márgenes irregulares y una base necrótica cubierta de una membrana fibrosa amarillenta (99). La lesión puede avanzar e invadir los genitales y muslos. Son extremadamente dolorosas, tanto, que es un signo indicativo del diagnóstico (158).

En la perforación, las lesiones pueden dirigirse a la cavidad peritoneal, resultando en una peritonitis aguda que a menudo causa la muerte del paciente. La perforación es múltiple principalmente en colon ascendente y cecum, también puede ocurrir perforaciones en otras zonas de la cavidad peritoneal involucrando otros órganos adyacentes como riñones, glándulas adrenales, etc. (99,158).

El absceso hepático amibiano (AHA), es la complicación extraintestinal más frecuente después de la amibiasis intestinal. El AHA es más frecuente en el hombre que en las mujeres (6,14). la puerta de entrada es el intestino grueso que ha sufrido la invasión de E. histolytica; por vía porta los parásito son llevados al hígado (14,42,158). La etapa inicial consiste en la formación de pequeños focos que contienen trofozoitos y células mononucleadas. Luego se presenta liquefacción de la zona central por necrosis y hemorragias que dan origen a un material gelatinoso inicialmente amarillento, frecuentemente rodeado por un anillo de tejido hepático congestionado. El material necrótico puede ser firme, semifluido o blando y se localiza en la parte interna de la lesión hepática. En la periferia del absceso se encuentran tejido hepático en destrucción, fibrosis, linfocitos, plasmocitos y trofozoitos (99,158). El tamaño del absceso varía considerablemente, desde lesiones de puntos hasta masas extremadamente grandes de material necrótico que puede llegar a reemplazar el 70 % del órgano normal. El tamaño promedio del AHA es de 5 a 15 cm de diámetro y generalmente se localiza en el lóbulo derecho y es más frecuente uno que múltiple. El AHA puede romperse en la cavidad peritoneal que generalmente es súbita y casi siempre fatal (99,158).

Otros órganos invadidos por las amibas cuando hay ruptura de un absceso hepático en la cavidad torácica son el pulmón y el corazón, aunque son casos extremadamente contados. La

mayoría de las lesiones en el pulmón son a nivel de la pleura y frecuentemente localizadas en el lado derecho del tórax: dado que el AHA generalmente involucra el lóbulo derecho del hígado. La necrosis pulmonar amibiana es de consistencia musinosa y limitada por el parénquima pulmonar (14,73,157). La pericarditis amibiana es infrecuente debido a la estrecha relación del pericardio con el lóbulo izquierdo del hígado y aparece cuando los abscesos se encuentran en ese lado del hígado (97).

La amibiasis cerebral se considera una rareza, ésta nunca aparece en ausencia de un AHA. La presencia de amibas en el cerebro se explica cuando hay concomitancia del absceso pulmonar o puede pasar por el pulmón sin afectarlo. Las lesiones cerebrales están predominantemente localizadas en el lóbulo izquierdo del cerebro y es raro que involucre al cerebro y meninges (99). Las lesiones pueden ser simples o múltiples, varían de tamaño (0.2 a 5.0 cm). Aparecen como áreas pequeñas ablandadas con petequias o como grandes fuentes necróticas amarillentas mezcladas con manchas hemorrágicas (14,158).

2.7 Respuesta inmune a la amibiasis.

En los últimos años la investigación de la interacción de la amiba con el sistema inmune del hospedero, ha proporcionado gran información a cerca de las funciones del sistema del complemento, inmunidad humoral y la inmunidad celular.

Complemento.

El sistema del complemento participa en el daño a los trofozoítos por dos mecanismos (16):

1) Lisis directa, como resultado de la activación del complemento en la superficie celular sin la participación de los anticuerpos.

2) Daño del complemento mediado por los anticuerpos.

Se ha demostrado que la amiba es capaz de activar la vía alterna del complemento de los sueros de pacientes con AHA (48,90) y aún en sueros recién obtenidos de personas sanas, es decir, sin antecedentes de haber padecido la enfermedad o ser portadores de las formas infectantes (91). También activan la vía clásica, que lleva a la rápida muerte del trofozoíto en ausencia de anticuerpos (18). Además se ha visto que las cepas no patogénicas de E. histolytica tratadas con suero humano normal son susceptibles a la lisis activando la vía alterna del complemento, en cambio las cepas patogénicas son resistentes (22,118,120).

El sistema del complemento parece ser importante en la defensa del hospedero contra la infección del parásito. Se ha visto que en hamsters descomplementados con factor de veneno de cobra, son más susceptibles a la amibiasis hepática experimental que en los hamsters normales tomados como control (22). A pesar de ello, se ha detectado que las cepas patógenas de amiba pierden susceptibilidad a los efectos del sistema del complemento (20).

Recientemente Reed y colaboradores (119), demostraron que una proteasa neutra soluble (53) secretada por la amiba con un PM de 55 KDa, corta el C3 del sistema complemento en dos fracciones idénticas a las producidas por las C3 convertasas, tanto de la vía clásica como de la vía alterna del complemento. Esta cisteín-proteasa corta la cadena alfa del C3 en las posiciones 76-77 del péptido, un aminoácido después del corte hecho por las C3 convertasas. Los fragmentos obtenidos por la proteasa amibiana tienen función y efecto fisiológico idéntico a las fracciones C3a y C3b obtenidas por las enzimas propias del sistema.

Inmunidad humoral.

Las inmunoglobulinas [Ig's] en las secreciones externas, constituyen una de las líneas de defensa contra la invasión de patógenos potenciales. Así, para la amibiasis intestinal se han detectado Ig's que se denominan coproanticuerpos, debido a que se han detectado en las heces fecales, principalmente Inmunoglobulina A secretoria [IgAs] (92). La principal característica de esta inmunoglobulina es su resistencia a la proteólisis; activa la vía alterna del complemento, lo cual puede proporcionar cierta función protectora y promueve la inflamación. Su función principal es unirse a los epítopos antigénicos de los microorganismos, que restringe su movilidad e impide su unión al epitelio mucoso (31). La presencia de la IgAs anti-amiba se han demostrado en la bilis de ratas

inmunicadas con E. histolytica (1) y recientemente en calostro (2) y leche humana de madres lactantes (39).

Durante la infección hay anticuerpos específicos circulantes los cuales son detectados en los pacientes una semana después de los primeros síntomas (139). Predominantemente son de la clase IgG (61,67) subclase IgG2 (8). También se encuentran títulos elevados de anticuerpos IgM, IgA e IgE, pero en menor grado que la IgG (147). Sin embargo, los altos títulos de anticuerpos no necesariamente correlacionan con la severidad de la amibiasis en el hombre (147), de hecho, los altos títulos de anticuerpos persisten después que la enfermedad ha sido curada o cuando la infección subclínica esta controlada (147). Esta persistencia de anticuerpos puede durar varios años después de la recuperación (47,96).

Las funciones más importantes de los anticuerpos en la respuesta inmune se han obtenido por pruebas in vitro. Varios estudios han demostrado que el suero inmune humano y la fracción de gammaglobulinas de estos sueros inhiben el crecimiento de E. histolytica (146), los mismos sueros neutralizan la patogenicidad de la amiba (142). Las Ig's y suero inmune humano protegen parcialmente al hamster contra la inoculación hepática de la amiba (143). La IgG inmune inhibe la adhesión del trofozoito a la célula blanco así como de los extractos libres de amiba (56). Sin embargo, en la infección no hay datos que apoyen el papel protector de los anticuerpos (147,154).

Inmunidad celular.

Los mecanismos inmunes mediados por células, parecen tener una función primordial en la defensa del hospedero contra E. histolytica. El desarrollo de la inmunidad celular se ha demostrado en la amebiasis invasiva por pruebas de hipersensibilidad retardada en piel, producción del factor inhibidor de macrófagos [MIF], respuesta blastogénica, inhibición de la adherencia leucocitaria (56,139,146).

Las actividades inmunes celulares en la amebiasis invasiva parecen ser las responsables de delimitar la infección inicial y de proporcionar protección al hospedero contra la infección invasiva (110). Las células polimorfonucleares [PMN] son la línea de defensa a nivel celular que tienen el primer contacto con las amibas, sin embargo, los PMN son eliminados por el parásito (125). Estudios realizados sobre la interacción de PMN y amibas, han revelado que se requiere una alta cantidad de PMN para matar un trofozoíto amibiano de alta virulencia [cepa HM1 IMSS], mientras que se requieren pocos PMN para matar amibas de virulencia intermedia [cepa NIH-H 303] (40,131). A la inversa los trofozoítos axénicos [cepa HM1 IMSS] matan a las células mononucleadas de sangre periférica, monocitos, macrófagos (128), PMN (131), y linfocitos T sin perder su viabilidad (125). El proceso de lisis de amibas por los PMN está mediado por un proceso que no involucra los metabolitos oxidativos de los PMN (40). Además se ha sugerido que las amibas fagocitan a las PMN y los

restos o contenido liberado de estas últimas contribuyen a la necrosis del tejido invadido por las amibas (24,131,150).

El Interferon gamma [IFN γ], es una de las linfocinas responsables de la activación de fagocitos mononucleares en la infección amibiana (127). El IFN γ por sí mismo es suficiente para activar macrófagos de pacientes tratados con AHA que eliminan a las amibas in vitro. Además la producción de IFN γ se eleva cuando los linfocitos de los pacientes con AHA tratados se estimulan previamente con antígeno amibiano (127).

Los macrófagos de personas sanas, activados con linfocinas pero no con antígeno amibiano son capaces de matar amibas virulentas, requiriéndose una proporción de 100 macrófagos por amiba (126). Los macrófagos de pacientes con AHA, cuando se activan por otras linfocinas y antígeno de amiba, también son capaces de eliminar al parásito amibiano (126). Cuando los macrófagos de hamster son dañados por partículas de sílica (35) o suero antimacrófago (36) hay aumento del tamaño del absceso hepático y la diseminación del parásito a otros tejidos. La estimulación de macrófagos con la vacuna BCG, produce el efecto contrario, es decir, protege al hamster contra la formación de abscesos y disminuye el tamaño de los mismos (35).

Los linfocitos T [LT] de personas sanas son capaces de matar in vitro trofozoítos virulentos cuando son previamente estimulados con mitógenos (124,128,129). La activación de LT de

pacientes con absceso hepático con lectinas como la Con A. fue menor a la presentada por los LT de personas sanas: la respuesta a fitohemaglutinina [FHA] fue parecida tanto en los LT de pacientes como en los de personas sanas. También las proteínas amibianas inducen la producción de linfocinas efectivas (una de ellas [FNT]) (127) que activan macrófagos normales para matar amibas virulentas (130).

Se ha demostrado que los principales fenotipos de LT presentes en la amibiasis hepática son los LT cooperadores [CD4], y los LT supresor/citotóxico [CD8]. Se ha detectado una disminución de CD4 y un aumento de CD8, lo que da una proporción CD4/CD8 < a 1:0, que indica una baja proliferación de CD4 probablemente debido a la actividad supresora de CD8 a nivel de sangre periférica (126).

La recurrencia de amibiasis en pacientes que ya han padecido la enfermedad es rara y se piensa se debe a que la inmunidad celular lo protege de forma eficaz (158). De los trabajos sobre inmunidad celular contra la amibiasis hechos in vitro, se piensa que para la activación de la inmunidad celular se requiere como inductor al antígeno amibiano, que desencadena la producción de linfocinas que a su vez estimulan a los macrófagos y LT para contrarrestar la infección por E. histolytica (132).

Por otra parte, aunque se ha manejado la posibilidad de emplear antígenos de E. histolytica como vacunas, y no obstante que se han obtenido buenos resultados con modelos de

animales experimentales inmunizados con antígenos amibianos (3). Los problemas inherentes a la complejidad del parásito y la falta de una adecuada definición de los antígenos amibianos (3), aún no se ha podido establecer una vacuna contra la amibiasis que confiera una buena protección contra la amiba en la población humana.

2.8 Diagnóstico.

El diagnóstico de la amibiasis intestinal se puede realizar por varios procedimientos, pero en la práctica normalmente sólo se basa en los datos clínicos y algunas veces por la presencia de las amibas en las heces.

El diagnóstico de la amibiasis intestinal requiere la diferenciación de otros padecimientos intestinales como la brucelosis del colon y colitis ulcerativa idiopática. La forma de colitis fulminante debe ser diferenciada de la shigellosis e infecciones con Escherichia coli, Vibrio colera,

Campilobacter spp y Salmonella spp. (14).

El examen de laboratorio se basa principalmente en detectar la presencia de trofozoitos y quistes de E. histolytica en las evacuaciones del paciente. La prueba principal se hace en una muestra de materia fecal diluida con solución salina al 0.85 %, en el caso de una evacuación líquida, y por concentración en sulfato de zinc o mercuriobato-yodo-formol en heces blandas o consistentes (154). En la muestra vista al microscopio se observa la motilidad de la forma vegetativa o con

eritrocitos fagocitados. Ello se hace con el objetivo seco 40x y se confirma con el objetivo de inmersión (45). Los trofozoitos y quistes de E. histolytica deberán de ser diferenciados de otros parásitos intestinales amebianos tales como E. hartmanni, E. coli, E. polecki, Endolimax nana, Iodamoeba buschtlii y Dientamoeba fragilis, basandose en la morfología del núcleo y por el número de los mismos en los quistes de estos parásitos (14,42,85,158). Esto último es muy importante para la clasificación del género y especie. Debe de tomarse en cuenta que la eliminación de los parásitos en la materia fecal no es constante, por lo que se recomienda examinar de 3 a 4 muestras de heces pasados 1 a 3 días después de la primera muestra (48).

Otros métodos raramente usados son la radiografía, cuando se sospecha de megacolon tóxico (158), y la rectosigmoidoscopia, que permite visualizar las ulceraciones a nivel del colon, detectandose tamaño y forma de la lesión, así como de la mucosa en general (42,47).

El AHA se considerara en pacientes con fiebre, examen abdominal anormal, hepatomegalia, pruebas de laboratorio que sugieren lesión en el hígado (117,126). En las pruebas de laboratorio se observa leucocitosis [12,000 a 30,000 cel/mm], elevación de la fosfatasa alcalina y bilirrubina conjugada. Otras pruebas de funcionamiento hepático pueden ser normales o ligeramente elevadas (126,141).

Los exámenes radiológicos para el AHA permiten detectar y

observar el tamaño del absceso empleando I-Rosa de Bengala, tecnecio o galio (14). Actualmente hay tres nuevos métodos de diagnóstico hepático los cuales determinan la localización número y evolución del AHA (108). Ellos son: La centelleografía o gammagrafía, empleando isótopos radiactivos; La sonografía o ultrasonido, que diferencia masas sólidas de aquellas que contienen líquidos; y el procedimiento más exacto, la tomografía axial computarizada o escanografía, que permite mediante el uso de un agente de contraste, visualizar la presencia un halo hiperdenso en la periferia del absceso, característica útil para diferenciarlo de otras lesiones focales del hígado (52,141).

En años recientes, las pruebas serológicas (144) han sido de gran valor tanto en el diagnóstico de la amibiasis invasiva en pacientes infectados por el parásito, así como en los estudios seroepidemiológicos de la diseminación de la amiba en la población (154). La mayoría de las pruebas de inmunodiagnóstico se basa en la detección de anticuerpos específicos en el suero humano (44).

Las pruebas serológicas principalmente usadas son: Hemaglutinación indirecta [IHA] (54,106,107), Inmunofluorescencia indirecta [IF] (37), Contraimmunoelectroforesis [CIEF] (140), Inmunodifusión de Duchterlony (10), y Ensayos inmunoenzimáticos ELISA (46,152). En IHA e IF son negativos con títulos de 1:8 a 1:32; positivos con 1:128 y graves cuando son de 1:512. La CIEF da un 98 % de positividad con los sueros de pacientes

con AHA. Las pruebas de ELISA, se han enfocado a la detección de antígeno amibiano en heces (95) y suero de pacientes (46). El método es sencillo y específico, aunque todavía no se emplea como prueba de rutina en el diagnóstico de la infección amibiana.

Actualmente varios investigadores se ha avocado a la detección de antígenos amibianos como complejos inmunes circulantes [CIC] en sueros de pacientes con AHA. Tales pruebas montadas son el RIA en fase sólida (79,101,102) y ELISA de doble sandwich (33,150). Estos métodos se basan en fijar un anticuerpo anti-amiba en una fase sólida [anticuerpo captor], se añade el CIC precipitado del suero con Polietilenglicol [PEG] y después se adiciona otro anticuerpo anti-IgG humana acoplado a Peroxidasa ¹²⁵I. Estas técnicas son altamente específicas y sensibles detectándose los CIC en un alto porcentaje de sueros de pacientes con AHA y evitando falsos positivos en los sueros control obtenidos de personas sin antecedentes de amibiasis.

Aunque se ha detecto que los anticuerpos captadores obtenidos de animales inmunizados con extracto de amiba cultivada axénicamente llevan anticuerpos contra proteínas del suero bovino, principalmente contra la albúmina y las Ig's (50,99). Tales anticuerpos reaccionan cruzadamente con las proteínas de suero humano, por lo cual la finalidad de este trabajo es el de eliminar las proteínas séricas bovinas absorbidas en las membranas de amiba antes de ser utilizadas como

inmunógenos para producir sueros antiamiba sin la presencia de anticuerpos con reactividad cruzada.

III OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

- * Eliminar las proteínas contaminantes del medio de cultivo axénico adheridas a la membrana de E. histolytica.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- * Obtener antígeno de membrana de amiba purificada para ser utilizado como inmunógeno y obtener sueros anti-amiba sin anticuerpos contaminantes
- * Producir sueros anti-amiba específicos a los epitopos de membrana de E. histolytica.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. Cultivo y cosecha de trofozoitos de amiba.

Los trofozoitos de E. histolytica cepa HMI-IMSS se cultivaron en medio axénico de Diamond (27). Este medio está compuesto por los siguientes reactivos:

Reactivo	Para 500 ml.
Biosata peptona	15.0 g
Dextrosa	5.0 g
NaCl	1.0 g
Fosfato monobásico de potasio	0.3 g
Fosfato dibásico de potasio	0.3 g
L-clorhidrato de L-cisteína monohidratada	0.5 g
L-acido ascórbico	0.1 g
Citrato férrico amónico	0.0114 g

Las sales se disolvieron en el orden citado en agua desionizada, se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 1.0 N. La mezcla se clarificó por filtración en papel Whatman del No. 1. Se pasó a frascos grandes y se esterilizó por autoclave. Se dejó enfriar a T.A. y se guardó a -20°C . Al medio ya estéril se le adicionó el suero bovino de complementado a una concentración final del 15 % (v/v), junto con una mezcla basal de vitaminas (Diamond) a una concentración final del 1.0%. El medio se pasó a tubos de vidrio de 10 x 125 mm con tapón de rosca. Estos tubos se llenaron al 75-80 % de su capacidad, se les

colocó el inóculo cosechado de amibas y se dejaron incubando a 36.5°C de 72 a 96 horas. La cosecha del parásito se hizo colocando los tubos en un baño de hielo-agua de 5 a 10 min.. los tubos se centrifugaron a 250g por 3 min a 4°C. Se desecho el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en FBS-A y repitiendo el procedimiento dos veces más.

4.2 Cosecha y obtención de membranas de amiba.

Se siguió el método descrito por Aley y colaboradores (4). Una vez cosechadas las amibas, estas se resuspendieron a razón de 20×10^6 amibas/ml en FBS-A que contenían MnCl 0.25 mM, CaCl 1.0 mM, y Don A a una concentración final de 100 ug/ml [ver apéndice A y B]. Se dejó incubando por 5 min. a 4°C. Después se centrifugó a 250g por 3 min. a 4°C. El paquete se resuspendió al mismo volumen con Buffer hipotónico, se dejó 10 min a 4°C. se desbarataron en un homogenizador de vidrio hasta observar lisis completa de las amibas (20 golpes). El homogeneizado se colocó sobre un gradiente de dos fases de manitol-sacarosa a razón de 4.0 ml de manitol 0.5 M sobre 2.0 ml de sacarosa 0.58 M; estos volúmenes del gradiente son para 20×10^6 cel/ml. Se centrifugó a 250g por 30 min a 4°C. El paquete obtenido del gradiente anterior corresponde a fragmentos de la membrana plasmática y restos celulares. Este paquete se resuspendió en 0.5 ml de alfa-MM 1.0 M y se dejó a 4°C por 45 min. El sobrenadante del gradiente de dos fases corresponde a las membranas internas , las cuales se

obtuvieron centrifugando a 40,000g por 1 hr a 4°C. Pasados los 45 min de incubación, las membranas se pasaron al botter de vidrio y se homogenizaron nuevamente [40 golpes]. El homogeneizado se colocó sobre un colchón de sacarosa 0.58 M y se centrifugó a 250g por 30 min en frío. El sobrenadante de la centrifugada anterior contenía las membranas plasmáticas las cuales se obtuvieron centrifugando a 40,000g por 1 hr a 4°C. Los paquetes obtenidos tanto de membranas internas como las plasmáticas se resuspendieron en un volumen mínimo de buffer hipotónico. Se tomó alícuotas para determinar la concentración de proteínas y se guardaron a -20°C hasta su uso.

4.3 Determinación de proteínas.

La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry (66). La muestra de 5 a 100 µg, en un volumen de 200 µl se colocaron en tubos de vidrio de 5 ml. También se incluyó una serie de muestras de proteína de concentración conocida de 0 a 60 µg de ovoalbúmina [1.0 mg/ml] para la curva estándar. A cada tubo se le añadió 1.0 ml del reactivo alcalino, se mezcló y se dejó por 15 min a T.A. Luego se le agregó 0.1 ml del reactivo de fenol, se mezcló y se dejó por 30 min. a T.A. La medición de la cantidad de proteínas se hizo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm. Se incluyó un tubo blanco en la serie; cada muestra se hizo por duplicado.

4.4 Tratamiento de las membranas de amica.

El tratamiento de las membranas se realizó de la siguiente manera [fig 1]. Se tomaron muestras de 1.0 mg de proteínas de membrana, se resuspendieron en 15.0 ml de cada uno de los siguientes agentes caotrópicos:

- 1) Acido acético 0.1 M-NaCl 0.5 M.
- 2) Acido acético 0.1 M-NaCl 1.0 M.
- 3) Acido acético 0.1 M-NaCl 3.0 M.
- 4) Buffer citrato-fosfato 12.5 mM pH 3.8 NaCl 0.175 M.
- 5) Urea 2.0 y 4.0 M.
- 6) Clorhidrato de guanidina 1.0, 2.0 y 4.0 M.
- 7) NaCl 1.0, 3.0 y 5.0 M.
- 8) Buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5.

Las mezclas se hicieron en tubos de polipropileno con tapón de rosca. Estos tubos se sumergieron en una mezcla de hielo seco-acetona el tiempo suficiente hasta que el contenido solidificó completamente. Inmediatamente se pasó a un baño de agua a 37°C, dejándose hasta que la mezcla estuviera completamente líquida. Después se dejó a 4°C por 18 hr. Pasado este tiempo se centrifugó la muestra a 40,000g por 1 hr a 4°C. Se desechó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en el mismo agente caotrópico repitiéndose el tratamiento de congelamiento-descongelamiento una vez más. Luego se dejó 4 hr a 4°C. Se centrifugó a las mismas condiciones y la pastilla se resuspendió en 15 ml de PBS, volviéndose a repetir el

proceso de centrifugado a las mismas condiciones. Al final de esta última centrifugada la pastilla se resuspendió en un volumen mínimo de PBS y se guardó a -20°C . Se le determinó el contenido de proteínas.

4.5 Obtención de antisueros.

Se inmunizaron dos conejos de la raza Nueva Zelanda de 1:5 a 2.0 kg de peso. A cada conejo se le inyectó vía intramuscular el antígeno a 1.0 mg/ml junto con Adyuvante Completo de Freund (ACF), en una proporción de 1:2 [Fig 2] (21,156). Los antígenos usados fueron suero bovino y extracto total de amiba. A los 14 días después de la primera inyección se aplicó otra de antígeno en las mismas condiciones pero con Adyuvante incompleto de Freund, se repite una vez más este paso. A los 10 días de la tercera inmunización se dio un refuerzo sin adyuvante, y a los 10 días siguientes se sangró al animal por punción cardiaca. Antes de iniciar la inmunización se sangró al animal para obtener suero preinmune.

Para obtener el suero de cabra anti-IgG de conejo, el animal se inmunizó con IgG de conejo purificada (ver sección 4.6) mezclada con ACF en la misma proporción que la empleada en los conejos. Además de seguir el mismo protocolo de inmunización. El suero de cabra se obtuvo sangrando al animal por la yugular.

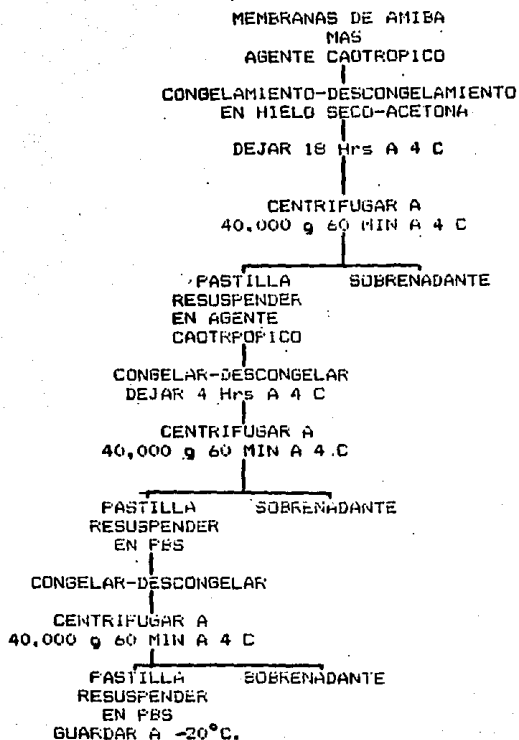


Fig. 1 Tratamiento de las membranas de E. histolytica con agentes caotrópicos.

4.6 Precipitación de inmunoglobulinas de conejo

El suero normal de un conejo se centrifugó a 10.000g por 5 min. con el fin de eliminar las proteínas desnaturalizadas. Se tomó el sobrenadante y se diluyó 1:4 con buffer de boratos 50mM pH8.5. Se le añadió un volumen de SAS (21.155) mediante goteo lento y con agitación suave y constante en frío al suero diluido, el SAS quedó al 50% de saturación. Se dejó que alcanzara el equilibrio por 1 hr con agitación suave y en frío. Luego se centrifugó a 10 000 g por 15 min. se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en con buffer de boratos al volumen original de suero. Se saturó nuevamente con SAS al 50% y se repitió el proceso una vez más. Al final la pastilla se resuspende en el mismo volumen inicial y se satura al 33% con SAS. Al final la pastilla se resuspende en la tercera parte del volumen original de suero y se coloca en una bolsa de diálisis. La preparación se dializa contra 100 volúmenes de buffer de boratos 17.5 mM pH 6.3 a las mismas condiciones. El dializado se retiró cuando la prueba con cloruro de bario al 20% no detectó la presencia de iones sulfato. Esto es, se tomó 0.1 ml del líquido dializante al cual se le añadió 0.2 ml de HCl 0.2 N y luego 0.2 ml de cloruro de bario, la formación de un precipitado blanco indica diálisis incompleta. El dializado se retiró y se dejó tomar la temperatura ambiente. El precipitado de la bolsa se resuspendió en un volumen mínimo de buffer de fosfatos y se trato de disolver, se centrifugó a las condiciones anteriores

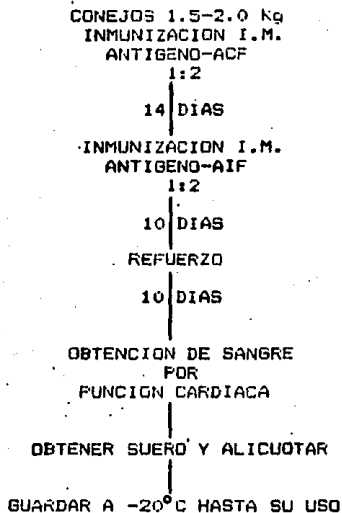


Fig. 2 Esquema de inmunización de conejos para obtener antisueros contra suero bovino y extracto total de amiba.

se recogió el sobrenadante, el cual se mezcló con el dializado. Al dializado se le determinó la cantidad de proteínas tomando una alícuota que se diluyó en NaOH 0.1 N, leyéndose la absorbancia a 280 nm.

Para calcular la concentración de Ig's se usó la relación:

$$\text{mg/ml de Ig's} = \frac{\text{D.O. a } 280\text{nm}}{1.664} (\text{Factor dilución})$$

Donde 1.664 es el coeficiente de extinción de las Ig's.

4.7 Purificación de las IgG de conejo por columna de intercambio iónico.

4.7.1 Activación de la DEAE-52.

La activación de la Dietilaminocetil-celulosa [DEAE-c] (Whatman, England), se hizo de la siguiente forma (155): se pesaron 50 g de DEAE-52, se lavó con un litro de HCl 0.5N. Se agitó suavemente la resina y se dejó sedimentar por 30 min. Se descartó el sobrenadante y la resina se lavó varias veces con agua desionizada dejando sedimentar 30 min. Ello se hizo hasta que el pH de la resina fue de aprox. 5.0. La DEAE-c se resuspendió en fosfato monobásico de potasio y se dejó toda la noche. Al día siguiente se quitó el sobrenadante y la resina se lavó con la misma solución. Luego se lavó cinco veces con agua desionizada. Después se resuspendió en NaOH 0.5 N y se dejó por 4 hr. Se pasó a etanol al 70% y se dejó

2hr. Lavandose la resina después con etanol al 70%. Se resuspendió en NaOH 0.05 N y se dejó sedimentar.

Después se lavó nuevamente con agua desionizada por 10 veces y luego con tres lavados con buffer de fosfatos 17.5 mM pH6.3. Inmediatamente se montó en una columna de 2.0 x 40.0 cm, y se equilibro con el buffer mencionado.

4.7.2 Purificación.

Para la purificación (155) de las Ig's de conejo, en la columna ya equilibrada se depositaron en el lecho 6.0 ml de Ig's dializadas contra el buffer de equilibrio. Se colectaron fracciones de 3 ml/tubo los cuales se leyeron en el espectrofotómetro a 280 nm. Se mezclaron las fracciones con alto contenido de proteínas y se concentraron a través de una cámara de AMICON con membrana de exclusión de 30 KDa. Se determinó la pureza por electroforesis. La columna se lavó después con buffer de fosfatos 0.2 N pH 8.0.

la columna se guardó a 4°C. Luego se reativo la DEAE-c.

4.8 Obtención de Ig's de caprino anti-IgG de conejo por cromatografía de afinidad.

4.8.1 Conjugación de IgG de conejo a sepharosa.

La activación se realizó por el método de March et. al. (71). Se mezclaron volumen a volumen Sepharosa (CL- 4B 200 Sigma Chemical Co. USA), lavada con agua destilada.

conteniendo 50% de sedimento (10 ml), con 50% de carbonato de sodio 2.0 M. La mezcla se colocó en un matraz en baño de hielo agitándose vigorosamente. Se le agregó otro volumen igual de Carbonato de sodio (20 ml). Luego se le añadió 0.075 vol (1.5 ml) de bromuro de cianógeno en acetonitrilo a razón de 2 g/ml. Esto se hizo en la campana de extracción cubriendo el matraz para evitar que escaparan los gases de cianuro. La mezcla se agitó por 2 min; luego se transfirió a un embudo buchner en un matraz kitasato con papel filtro poroso (Whatman no. 541), cuidando de dirigir el aire expulsado hacia la campana de extracción. Una vez activada la sepharosa se lavó en el embudo con 10 vol (200 ml) de buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5, 10 vol de agua destilada, y 10 vol de buffer carbonatos 0.2 M pH 9.5. Al terminar la masa de gel húmeda se pasó a un recipiente de plástico que contenía 32.5 mg de IgG de conejo, total [previamente dializada contra buffer carbonatos 0.2 M pH 9.5]. Se incubó por 20 hr a 4°C. Al término de la incubación se retiró el sobrenadante y se le adicionó al gel 0.05 vol (2.0 ml) de glicina 2.25 M, dejándose por 2 hr a T.A. Se eliminó el líquido y la sepharosa conjugada se lavó con: 20 vol (400 ml) de buffer acetatos 0.1 M pH 4.0, NaCl 0.5 M; 20 vol de urea 2.0 M, NaCl 0.5 M; 20 vol de buffer carbonatos 0.1 M pH 10.0, NaCl 0.5 M; y 20 vol de PBS pH 7.0.

En estas condiciones el gel estuvo listo para montarse en una columna o bien guardarse a 4°C. en PBS conteniendo azida de sodio al 0.1%.

4.8.2 Purificación de los anticuerpos de caprino anti-IgG de conejo por la columna de sepharosa-IgG de conejo.

La purificación se hizo de la siguiente manera (105,153). La columna con el gel conjugado se lavó con buffer glicina-HCl 0.2 M pH 2.8. Inmediatamente se lavó con PBS hasta que el pH de la elución fuera neutro. Sobre el lecho del gel se colocó un volumen de suero de caprino anti-IgG de conejo igual al volumen de sepharosa. Se permitió penetrar el suero sobre el gel y se recirculó sobre la columna con ayuda de una bomba peristáltica por 3 ocasiones. Una vez recirculado el suero se eluyó y la columna se lavó con PBS hasta que ya no se detectaron proteínas en el eluido. (D.O. < 0.05 a 280 nm). Luego se colocó el buffer glicina-HCl 0.2 M pH 2.8 para eluir el anticuerpo unido a la sepharosa conjugada. El eluido se colectó en fracciones de 1.0 ml. neutralizándose inmediatamente con 62 µl de Tris base 1.0 M. a pH 7.4. Los tubos con mayor contenido de inmunoglobulinas se mezclaron y se les determinó la concentración de proteínas. Una vez eluidos los anticuerpos la columna se lavó con PBS hasta que el pH del eluido fuese neutro. La columna se guardó a 4°C con azida de sodio al 0.1 %.

4.9 Conjugación de anticuerpos de caprino anti-IgG de conejo a Peroxidasa.

Se utilizó el método de acoplamiento de dos pasos (94). Se disolvieron 10 mg de Peroxidasa (p8375 Sigma Chemical CO.

USA), tipo VI. RZ 3.0. en buffer fosfatos 0.1 M pH 7.0 con glutaraldehído al 1.25 %. La preparación se dejó 18 hr a T.A. La peroxidasa activada se pasó a través de una columna de Sephadex G-25 en una columna de 0.1 x 15 cm., equilibrada con NaCl 0.154 M. Las fracciones de color café se recolectaron en un volumen total de 0.95 ml. A la enzima sin glutaraldehído libre se le añadieron 5.0 mg de Ig's de cabra anti-IgG de conejo dializada contra NaCl 0.154 M. más 0.1 ml de buffer carbonatos 1.0 M pH 9.5. Se dejó incubando 24 hr a 4°C. Después se le agregó 0.1 ml de lisina 0.2 M, dejándose 2 hr a T.A. El conjugado se dializó contra PBS por 12 hr con cambios cada 4 hr. El dializado se alicuotó en pequeños volúmenes y se le agregó un volumen igual de SAS y se almacenó a 4°C (80). Para usar en conjugado, el vial con la preparación se centrifugó 15 min. a 4°C en la microfuga. La pastilla se resuspendió en la mitad de volumen original con PBS.

4.10 Ensayo inmunoenzimático.

El ensayo inmunoenzimático en fase sólida [ELISA] se empleó para detectar las proteínas absorbidas en las membranas de ameba después del tratamiento con agentes castrópicos.

A cada pozo de una placa de 96 pozos (Nunc 4-37454, Thomas Scientific USA), se le colocó 50 µl de antígeno a partir de una concentración de 25 µg/ml y de diluciones dobles seriadas a partir de esa concentración. Los antígenos fueron suero ovino, extracto total de ameba, membranas sin tratar y membranas tratadas en agentes castrópicos. La placa

se dejó incubando toda la noche a 37°C. Se aspiró el antígeno y la placa se saturó con gelatina al 0.5 % en PBS dejándose 1 hr a 37°C. Los pozos se lavaron tres veces con PBS-T. Se colocó el primer ligando, esto es, suero preinmune de conejo, suero de conejo anti-suero bovino y suero de conejo anti-amiba respectivamente en una dilución 1:500 en PBS-T en cada fila de la placa sensibilizada. La placa se incubó 2 hr a 37°C. Se lavó la placa con PBS-T y se le añadió el conjugado de IgG de cabra-Peroxidasa anti-IgG de conejo a una dilución 1:1000 en PBS-T incubándose a las mismas condiciones. Se lavó nuevamente la placa y en la penumbra se le añadió el sustrato revelador OP a una concentración de 0.5 mg/ml con H_2O_2 al 1.2%, la placa se cubrió de la luz y se incubó a 37°C por 15 min, observando la placa cada 5 min. La reacción se paró colocando en cada pozo 100 μ l de H_2SO_4 4.0 N

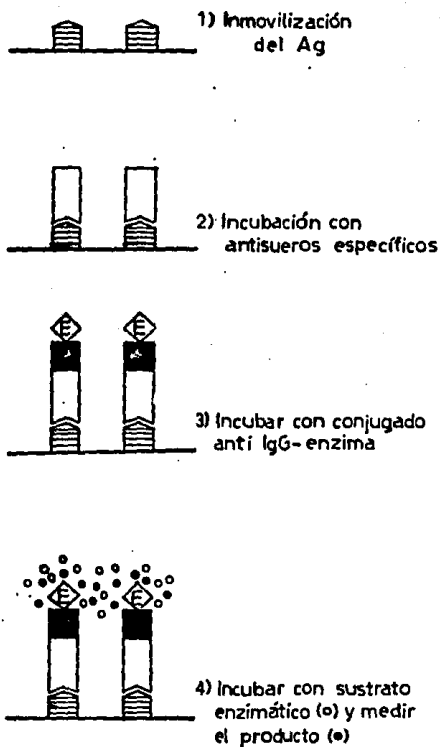


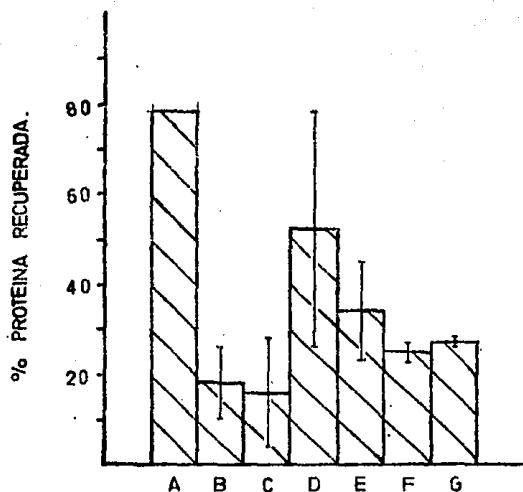
Fig. 3. Elisa para la detección de proteínas contaminantes en las membranas de ameba tratadas con agentes caotrópicos.

V. RESULTADOS.

5.1 Tratamiento de las membranas de amiba.

Como se puede apreciar en la gráfica 1, los rendimientos de las proteínas de membrana recuperadas después del tratamiento con agentes caotrópicos varió dependiendo del reactivo usado. Se obtuvo un porcentaje de 50 % de proteína recuperada con ácido acético 0.1 M NaCl 0.5 M, mientras que los rendimientos más bajos se obtuvieron con el buffer citrato-fosfato 12.5 mM pH 3.6-NaCl 0.5 M y con el buffer hipotónico, que fueron menores del 20 %.

También se realizaron experimentos en los cuales se dieron tratamientos combinados con diferentes agentes caotrópicos, es decir, un ciclo de congelamiento-descongelamiento se hizo con un agente dado y el segundo ciclo con otro diferente. Los resultados de estos tratamientos se muestran en la Tabla I.



Gráfica 1. Porcentaje de proteínas amibianas recuperadas después del tratamiento con diferentes agentes caotrópicos: A) control en PBS; B) buffer hipotónico; C) buffer citrato-fosfato 12.5 mM pH 3.8 NaCl 0.5 M; D) ácido acético 0.1 M NaCl 0.5 M; E) ácido acético 0.1 M NaCl 3.0 M; F) clorhidrato de guanidina 2.0 M; G) buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5.

TABLA I.

RECUPERACION DE PROTEINAS DE MEMBRANA DE AMIBA
DESPUES DE TRATAMIENTOS COMBINADOS CON DOS
DIFERENTES AGENTES CAOTROPICOS.

Congelamiento-descongelamiento		% de proteína recuperada
1o. ciclo	2o. ciclo	
Guanidina 2.0 M	Guanidina 4.0 M	10.27
Ac. acético 0.1 M NaCl 0.5 M	Guanidina 2.0 M	24.90
Buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5	Guanidina 4.0 M	41.70

5.2 Ensayo inmunoenzimático.

La sensibilidad del ensayo inmunoenzimático (ELISA), se utilizó para monitorear la desaparición de las proteínas absorbidas en la membrana de amiba después del tratamiento con agentes caotrópicos. Como se puede observar en los controles de la fig.4, el suero de conejo anti-amiba lleva anticuerpos contra las proteínas de suero bovino [línea 3A], y además dichas proteínas son detectadas en el extracto total de amiba [línea 2B] y en las membranas purificadas [línea 2C] por un anticuerpo contra el suero bovino.

En las membranas tratadas con ácido acético 0.1 M-NaCl 0.3 M [fig. 4 línea 2D], se vio que la presencia de suero bovino se detecta a tres diluciones [$3.12 \mu\text{g/ml}$] de la concentración inicial de la proteína [$25.0 \mu\text{g/ml}$], mientras que en el control se detectan proteínas de suero bovino hasta la quinta dilución [$0.78 \mu\text{g/ml}$], es decir, se requiere una mayor concentración, de dos diluciones, de antígeno total de amiba para detectar los contaminantes de suero bovino.

Con el Clorhidrato de guanidina 2.0 M [Fig. 5] la presencia de contaminantes disminuye [línea 2D] con diferencia de una dilución, de $0.39 \mu\text{g/ml}$ a $0.78 \mu\text{g/ml}$, en las membranas tratadas con respecto a las que no lo están. Con el ácido acético 0.1 M, [fig. 5] también se observó una exclusión de contaminantes [línea 2E], con una diferencia de dos diluciones en la detección de contaminantes séricos con respecto a las membranas sin tratar de $0.39 \mu\text{g/ml}$ a $1.56 \mu\text{g/ml}$.

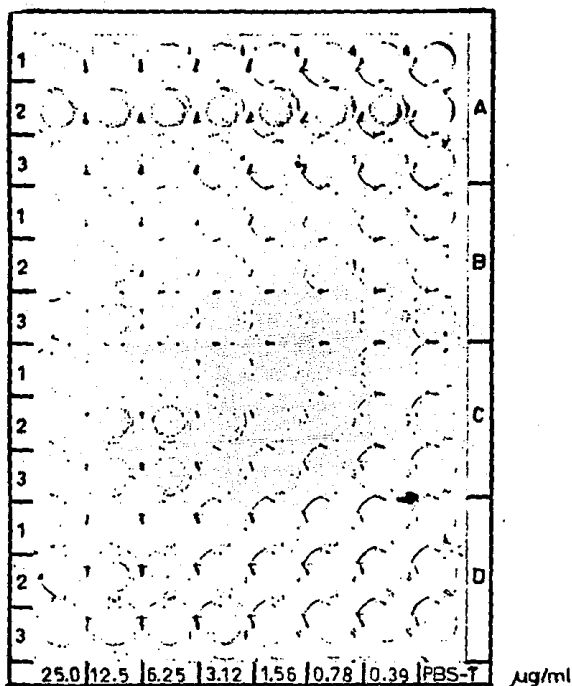


Fig. 4. ELISA para detectar proteínas absorbidas en las membranas de amiba después del tratamiento en ácido acético 0.1 M NaCl 0.5 M. Antígenos: A) suero bovino; B) extracto total de amiba; C) membranas internas sin tratar; D) membranas tratadas en ácido acético 0.1 M-NaCl 0.5 M. Sueros de conejo: 1) preinmune; 2) anti-suero bovino; 3) anti-amiba.

Fig. 5. Detección de proteínas absorbidas en la membrana de amiba después del tratamiento con varios agentes caotrópicos. Antígenos: A) suero bovino; B) extracto total de amiba; C) membranas internas no tratadas; D) Membranas tratadas con Clorhidrato de guanidina 2.0 M; E) ácido acético 0.1 M; F) urea 2.0 M; G) NaCl 3.0 M. Sueros de conejo: 1) preimmune; 2) anti-suero bovino; 3) anti-amiba.

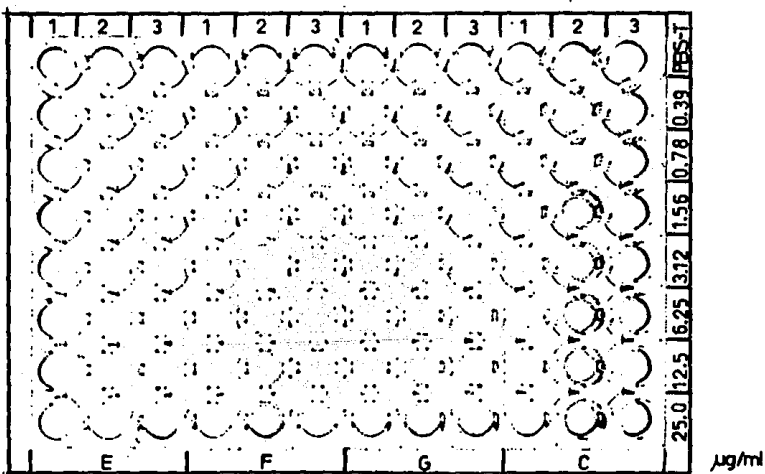
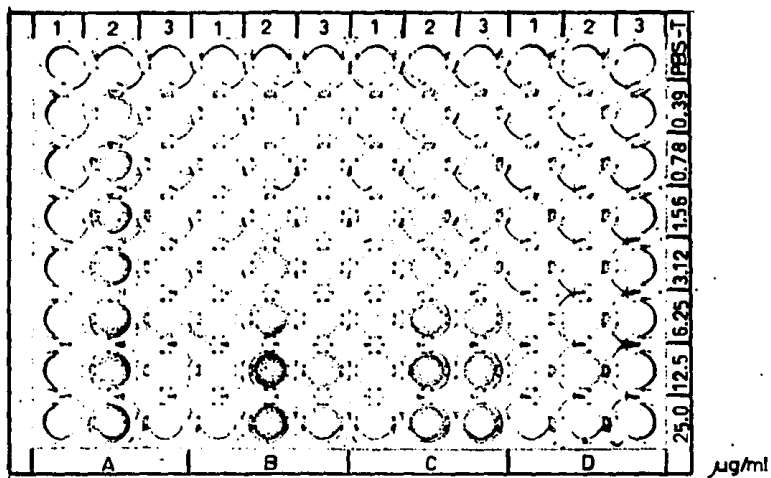


Fig. 5

Los tratamientos con urea 2.0 M y NaCl 3.0 M al parecer removieron poco de los contaminantes de las membranas amibianas. Como puede observarse en la fig. 5, línea 2F [urea] y línea 2G [NaCl], se detectan proteínas de suero bovino hasta la tercera dilución [$3.12 \mu\text{g/ml}$] de las membranas de amiba en ambos casos.

En la fig. 6, el tratamiento con guanidina 1.0 M [2D], excluye los contaminantes séricos de las membranas del parásito con una diferencia de dos diluciones [de 0.39 a $1.56 \mu\text{g/ml}$], con respecto a las membranas sin tratar [2C]. En la misma figura el NaCl 5.0 M [2E], no removió los contaminantes de las membranas de amiba.

Con la guanidina 4.0 M [fig. 6 línea 2F], se observó una aparente disminución de las proteínas séricas de la membrana del parásito, pero la detección de antígeno amibiano da la misma intensidad de coloración [3F] que con el antisuero bovino [2F].

El buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5 [2G en fig. 6], elimina también los contaminantes con diferencia de una dilución [de 0.78 a $1.56 \mu\text{g/ml}$] entre las membranas no tratadas y tratadas.

En la fig. 7, se observan los resultados de un tratamiento combinado de dos diferentes agentes caotrópicos como el ácido acético 0.1 M-NaCl 0.5 M junto con guanidina 2.0 M, revelando una buena exclusión de contaminantes séricos adheridos a la membrana [2D] con una diferencia de tres diluciones [de 0.39

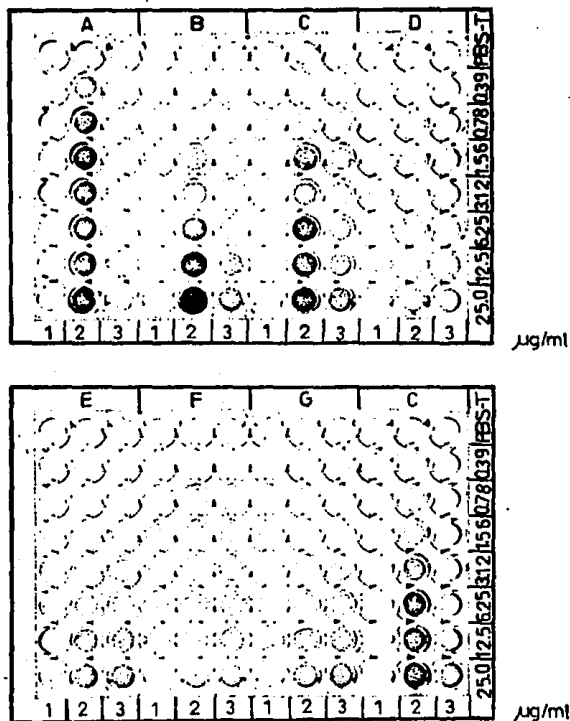


Fig. 6. Detección de proteínas contaminantes en las membranas de *E. histolytica* tratadas con diferentes agentes caotrópicos. Antígenos: A) suero bovino; B) extracto total de ameba; C) membranas internas sin tratar; D) Clorhidrato de guanidina 1.0 M; E) NaCl 5.0 M; F) Clorhidrato de guanidina 4.0 M; G) buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5. Sueros de conejo: 1) preinmune; 2) anti-suero bovino; y 3) anti-ameba.

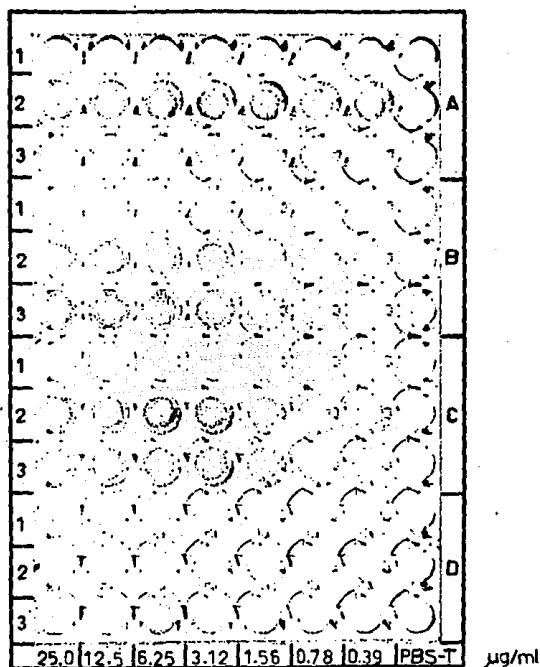


Fig. 7. ELISA para las membranas tratadas sucesivamente con ácido acético 0.1 M NaCl 0.5 M/clorhidrato de guanidina 2.0 M (D). Antígenos: A) suero bovino; B) extracto total de amiba; C) membranas internas sin tratar; D) con ácido acético 0.1 M-NaCl 0.5 M/guanidina 2.0 M. Sueros de conejo: 1) preinmune; 2) anti-suero bovino; 3) anti-amiba.

a 3.12 $\mu\text{g/ml}$ con respecto a las membranas no tratadas [2C]. Siendo este un tratamiento más efectivo que el obtenido con cada agente empleado por separado [fig.4 línea 2D y fig.5 línea 2D con títulos de 3,12 y 0.75 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente].

En la Fig. 8 I, se observan los resultados con un segundo sistema combinado de guanidina 1.0 M con guanidina 4.0 M [2C], que no fue tan eficiente como la primera combinación, pues se detectan proteínas contaminantes a la última dilución [0.39 $\mu\text{g/ml}$]. El tercer sistema combinado de buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5 con guanidina 4.0 M [2D], también dio el mismo resultado que la segunda combinación.

Para asegurar la efectividad del tratamiento de las membranas con los agentes castrópicos en cada ciclo de congelamiento-descongelamiento, se tomaron alícuotas en cada paso del experimento. Se observó que con un ciclo de congelamiento-descongelamiento, fig. 8 II, en el buffer carbonatos [2F] y guanidina 4.0 M [2E], hay poca eliminación de contaminantes séricos bovinos. Sin embargo, al segundo ciclo del tratamiento en el buffer carbonatos [2H] y con guanidina [2G], se observó una exclusión de suero bovino de las membranas del parásito de una y dos diluciones respectivamente.

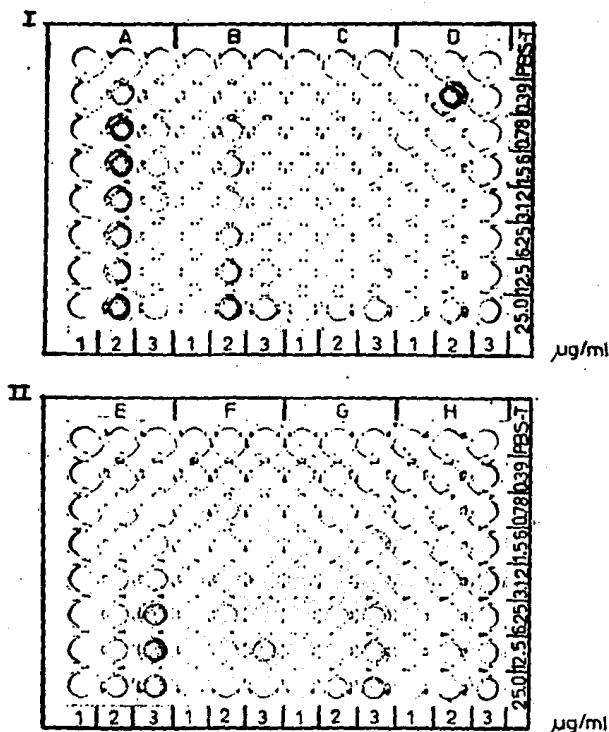


Fig. 8 I. Detección de proteínas absorbidas en la membrana de ameba después de un tratamiento combinado de guanidina 1.0 M con guanidina 4.0 M (C), y buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5 con guanidina 4.0 M (D).

II. Efectividad de los agentes caotrópicos durante el tratamiento de las membranas internas de ameba. Un ciclo de congelamiento-descongelamiento en guanidina 4.0 M (E), y buffer carbonatos (F). Con dos ciclos de congelamiento-descongelamiento en guanidina 4.0 M (G), y con buffer carbonatos (H). Antígenos: A) suero bovino; B) membranas internas sin tratar. Sueros de conejo: 1) preinmune; 2) anti-suero bovino; 3) anti-ameba.

VI DISCUSION.

Varios autores han reportado que los extractos antigénicos y las membranas obtenidas de trofozoítos de amiba llevan absorbidas proteínas provenientes del medio de cultivo, principalmente del suero bovino (34,84,121,136). Además los sueros anti-amiba obtenidos de animales inmunizados con estos antígenos contienen anticuerpos contra proteínas séricas ovinas (25,49).

Se ha intentado eliminar estos contaminantes séricos por lavados exhaustivos de los trofozoítos antes de la preparación del antígeno, pero sólo se consigue disminuir la presencia de las proteínas contaminantes sin excluirlas completamente, además que repercute en el rendimiento del inmunógeno preparado (34). Por otro lado, los sueros anti-amiba pasados por columnas de afinidad que contienen sepharosa conjugada a proteínas de suero bovino, tampoco eliminan completamente los anticuerpos anti-proteínas ovinas (43,79).

Dado este serio problema se propuso en el laboratorio eliminar las proteínas absorbidas a la membrana de Entamoeba histolytica por un tratamiento de congelamiento-descongelamiento en presencia de agentes caotrópicos (43). Debido a que tales agentes caotrópicos remueven proteínas adheridas débilmente por carga a la membrana dejando sólo a las proteínas integrales de membrana. Un ejemplo de la utilidad de los agentes caotrópicos es en la purificación de enzimas y proteínas tales como la succinato deshidrogenasa (29,43), el

complejo I del sistema de transporte de electrones mitocondrial (30) y muchos otros ejemplos (97).

El proceso de congelamiento-descongelamiento que permite la liberación del contenido vesicular (145), se utilizó debido a que las membranas de amibas obtenidas se encuentran en forma vesiculada y con este paso hay un mejor lavado y extracción de las proteínas del medio contenidas en tales membranas que han sido pinocitadas por el parásito del medio de cultivo. Los bajos rendimientos de proteína amibiana recuperada después de los tratamientos con agentes caotrópicos probablemente se deben a que las vesículas de membrana no están vacías, sino que acarrean proteínas solubles amibianas y otras captadas del medio. Además es de esperar que las sales extraigan junto con los contaminantes proteínas propias de la amiba adsorbidas débilmente a su membrana. Aún así, se tiene una recuperación del 23 % de proteína amibiana con tratamientos simples de ácido acético 0.1 M-NaCl 0.5 M, ácido acético 0.1 M con NaCl 3.0 M y guanidina 2.0 M, suficiente para usarse como inmunógeno. El método de tratamiento de las membranas amibianas por congelamiento-descongelamiento en agentes caotrópicos es sencillo y fácil de realizar, además que la muestra no se diluye.

El empleo del método de ELISA en la detección de proteínas adsorbidas en las membranas tratadas, se debió a que es una técnica sencilla, rápida, y sensible (145) en comparación a la inmunodifusión empleada en otros trabajos (34,49). Fue

importante emplear sueros controles para comparar la presencia de contaminantes en las membranas de E. histolytica obtenidas como tales y en las procesadas en agentes caotrópicos. Se observó una disminución pero no una eliminación completa de las proteínas absorbidas a la membrana después del procesamiento con altas concentraciones de sales (NaCl 1.0, 3.0 y 5.0 M; urea 4.0 M l. Aunque se ha reportado que las albúminas son solubles a pH's bajos (59) y en altas concentraciones de sales (7), las membranas tratadas bajo tales condiciones no quitaron del todo los contaminantes sérico bovinos entre las cuales la albúmina sérica bovina parece ser la principal proteína detectada (34,49,84,101,133).

De todos los agentes caotrópicos utilizados, los que mejores resultados dieron fueron el ácido acético 0.1 M NaCl 0.5 M y clorhidrato de guanidina 2.0 M, con diferencia de dos diluciones en ambos casos, pero la combinación de los dos anteriores fue más efectiva pues disminuyó sensiblemente la presencia de las proteínas contaminantes, que cada agente usado por separado (figura 7), con una diferencia de tres diluciones con respecto a las membranas sin tratar.

Por otro lado, la pérdida de reactividad de los anticuerpos anti-amiba con membranas tratadas con agentes caotrópicos puede deberse a que estos anticuerpos estén dirigidos a las proteínas solubles y las débilmente adheridas en la membrana de la amiba, las cuales son removidas por el tratamiento

empleado, quedando solo las proteínas integrales de membrana. Probando sueros de ratones inmunizados con membranas tratadas con ácido acético NaCl-guanidina [datos no mostrados], se observó que en el ELISA la presencia de proteínas contaminantes en la membrana de amiba es muy débil; la presencia de anticuerpos anti-proteínas bovinas disminuyó sensiblemente. También se comprueba que hay proteínas de suero bovino fuertemente absorbidas en la membrana de amiba que aún con el tratamiento de agentes caotrópicos no son removidas, a pesar de ser procesos muy drásticos comparados con los lavados de las amibas con PBS (49) o la solución salina isotónica (34).

Por consiguiente puedo decir que las membranas tratadas por congelamiento-descongelamiento en ácido acético NaCl-guanidina pueden ser empleadas como inmunógeno para producir sueros anti-amiba casi libres de la presencia de anticuerpos anti-proteínas absorbidas a la membrana de E. histolytica. Tales sueros serán útiles en técnicas de alta especificidad como el ELISA de doble sandwich en la detección de antígenos amibianos circulantes en los sueros de pacientes con amibiasis.

Sin embargo, en recientes estudios para la detección de complejos inmunes circulantes en los sueros de pacientes con amibiasis por métodos inmunoenzimáticos de ELISA (33) o en fase sólida (79) de doble sandwich parecen haber sido superados los problemas de reactividad cruzada. Estos investigadores usan dos métodos de purificación de anticuerpos específicos anti-amiba. Uno es pasando repetidamente los

sueros anti-E. histolytica, obtenidos de conejos inmunizados con extracto amibiano axénico, por columnas inmunoabsorbentes de suero bovino-sepharosa 4B, BSA-sepharosa 4B, y gammaglobulina bovina-sepharosa 4B (79,101,102). En el otro caso los anticuerpos anti-amiba son obtenidos de pacientes con AHA por precipitación en sulfato de amonio al 50 % de saturación. después estos anticuerpos semipurificados se pasan a través de un inmunoabsorbente de extracto soluble amibiano acoplado a sepharosa 4B (33). Ahora bien, aunque el uso de agentes catiónicos en la eliminación de proteínas de suero bovino absorbidas en la membrana de E. histolytica disminuye apreciablemente la presencia de los contaminantes séricos, un camino a seguir sería que contando con la posibilidad de emplear liposomas, vesículas que forman una bicapa lipídica constituida de fosfolípidos en el cual se incorporan únicamente proteínas con segmento transmembranal o integrales de membrana en medio acuoso (60,62), tales liposomas formados con proteínas de membrana de los trofozoitos de amiba deben incorporar solamente las proteínas intrínsecas de membrana excluyendo las proteínas solubles y periféricas. De tal forma, se obtendrán proteínas propias de la membrana amibiana libres de contaminantes del medio de cultivo. Con las proteínas propias de membrana amibiana se obtendrán sueros anti-amiba sin contaminantes, los que podrán emplearse en la detección de complejos inmunes en sueros de pacientes con amibiase, por ELISA de doble sandwich y el posible uso de

tales antisueros en el inmunodiagnóstico de la infección. Además, se podrá investigar la función de las proteínas integrales de membrana de amiba en la adhesión al epitelio intestinal, así como el papel de tales proteínas en la respuesta inmune del hospedero contra el parásito amibiano.

VII CONCLUSIONES.

- 1) La presencia de proteínas del medio de cultivo absorbidas a la membrana de Entamoeba histolytica disminuye en gran proporción, cuando son tratadas con una combinación de agentes caotrópicos. No obstante, las membranas de amiba están aún contaminadas con proteínas séricas bovinas que son detectadas después del tratamiento.
- 2) El mejor sistema para reducir la presencia de proteínas absorbidas es cualitativamente el tratamiento combinado de Acido acético 0.1 M-NaCl 0.5 M/Clorhidrato de guanidina 2.0 M.
- 3) Se obtiene suficiente antígeno amibiano purificado y sin diluir para emplearse como inmunógeno en la producción de sueros anti-amiba específicos para antígenos de membrana del parásito.

APENDICE

A. REACTIVOS USADOS.

A continuación se enlistan los reactivos utilizados en el presente trabajo, con su respectivo número de catálogo y casa comercial que lo proveyó:

J.T. Baker de México.

Fosfato monobásico de potasio (L-3246-20); Fosfato dibásico de potasio (L-32-52-20); Cloruro de sodio (L-36-24-25); Cloruro de manganeso (L-2540-20); Cloruro de calcio (L-1311-20-1); Manitol (L-2554-20); Sacarosa (L-4072-20-1); Carbonato de sodio (L-3602-20); Hidróxido de sodio (L-3724-32); Sulfato de cobre (L-1696-20-1); Tartrato de sodio y potasio (L-3262-14-1); Ácido acético glacial (L-9511-50-1); Ácido cítrico (L-0122-20); Fosfato de sodio dibásico (L-3506-20-1); Sulfato de amonio (L-0792-25); Ácido clorhídrico (L-9535-60); Fosfato de sodio monobásico (L-3818-20); Acetato de sodio (L-3460-20); Glicina (M-797-06-1); Gelatina (L-2124-20); Peróxido de hidrógeno (L-2186-56); Ácido sulfúrico (L-9691-63); Acetona (L-9254-62-3); Acetonitrilo (L-9255-62-1); Cloruro de bario (0790-20).

Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. U.S.A.

Concanavalina A (C2010); p-hidroximercuribenzoato (H 0642); alfa-metil mandeido (M 6882); Reactivo de fenol Folin Ciocalteu (F 5292); Clorhidrato de guanidina anhidro grado I (G4505); Ácido bórico (B 0522); Borax (B 9876); Sepharosa (CL-4B 200); Glutaraldehído (G 5882); Tween 20 (P 1379); o-fenilendiamina (P 3888); ovalbúmina (A 5253); Peroxidasa de rábano picante tipo VI R.Z. 3.0 (P 3875); Citrato férrico amónico (F 5879); Ácido ascórbico (A 0278).

Otros.

Lisina (4732) Eastman N.Y. USA.; Bromuro de clorógeno (C9-149-2) Aldrich USA; Suero de ternera Dibco USA; Biosate peptone Dibco USA; Clorhidrato de L-cisteína Merck RFA.

B. Preparación de soluciones.

* Reactivos para la cosecha y obtención de membranas de E. histolytica.

1.- Buffer fosfatos 15.0 mM pH 7.0, NaCl 0.15 M. [PES].

A) Fosfato monobásico de potasio 300 mM; PM: 136.091.

Pesar 81.65 g disolver en agua desionizada y aforar a 2.0 litros.

B) Fosfato dibásico de potasio 300 mM; FM 174.183.

Pesar 104.05 g, disolver en agua desionizada y aforar a 2.0 litros.

En el potenciómetro agregar la solución B a la solución A hasta llegar a un pH de 7.0. Guardar a 4°C.

2.- Cloruro de sodio 3.08 M; PM 58.44, Pesar 359.99 g, disolver en agua desionizada y aforar a 2.0 litros. Guardar a 4°C.

Tomar 50 ml del buffer fosfatos 300 mM, mezclar con 50 ml de cloruro de sodio 3.08 M y aforar a 1.0 litro. La concentración final es de 15 mM y 0.15 M respectivamente.

3.- Buffer fosfatos 15 mM pH 7.0, NaCl 0.185 M. [PBS-A].

Tomar 50 ml del buffer fosfatos 300 mM más 56.8 ml de cloruro de sodio 3.08 M y aforar a 1.0 l. Guardar a 4°C.

4.- Cloruro de manganeso 0.25 mM.

MnCl 100 mM; FM 179.9. pesar 0.0494 g, disolver en PBS y aforar a 25 ml. Tomar 0.25 ml y aforar a 10 ml la concentración final es de 0.25 mM. Guardar a 4°C.

5.- Cloruro de calcio 10 mM.

CaCl 100 mM; PM. 110.9. Pesar 0.2772 g, disolverlos en PBS y aforar a 25 ml. Tomar 1.0 ml de la solución y aforar a 10 ml la conc. final es de 10 mM. Guardar a 4°C.

6.- Solución de concanavalina A [Con A] 1.0 mg/ml.

Pesar 5.0 mg de Con A, y disolver en 5 ml de PBS. Tomar 1.0 ml y aforar a 10 ml con PBS. Prepararse al momento de usarse.

7.- Buffer Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 con pHMB 10 mM

[Buffer hipotónico].

Tris (hidroximetil)aminometano; PM. 121.1. Pesar 3.027 g, disolver en agua destilada y aforar a 100ml.

p-Hidroximercuribenzoato [p-HMB]; PM. 360.7. Pesar 0.9012 g y disolver junto con Tris.

Ajustar el pH de la mezcla Tris/p-HMB con HCl 0.1N hasta el pH 7.5. Preparar antes de usar.

8.- Manitol 0.5 M.

Manitol; PM. 182.178. Pesar 4.554 g, disolver en buffer hipotónico y aforar a 50 ml. preparar al momento de usarse.

9.- Sacarosa 0.58 M.

Sacarosa: FM. 342.3. Pesar 9.93 g. disolver en buffer hipotónico y aforar a 50 ml. Preparar al momento de usarse.

* Determinación de proteínas.

10.- Na_2CO_3 a. 2% en NaOH 0.1 N.

Pesar 10 g de bicarbonato de sodio, disolverlo junto con 2.0 g de NaOH; FM. 40.0, en agua desionizada y aforar a 500 ml. Guardar a 4°C.

11.- Sulfato de cobre 1.0%.

Pesar 1.0 g de sulfato de cobre, disolverlo en agua desionizada y aforar a 100 ml. Guardar a 4°C.

12.- Tartrato de sodio y potasio al 2.0%.

Pesar 2.0 g de tartrato de sodio y potasio, disolver en agua desionizada y aforar a 100 ml. Guardar a 4°C.

En el momento de usarse mezclar 1:1 sulfato de cobre más tartrato de sodio y potasio.

Reactivo alcalino: 25 ml de (10) más 0.5 ml de la mezcla anterior.

13.- Reactivo de Folin Ciocalteu. Diluir 1:2 con agua desionizada al momento de usarse. Guardar en 4°C.

* Tratamiento de las membranas de amiba.

14.- Acido acético 0.1 M, NaCl 0.5 M.

· Acido acético glacial; FM. 60.05, pureza 99.7%.

Tomar 0.3 ml de la solución concentrada de ácido y disolver en agua desionizada. NaCl, pesar 1.462 g y mezclar con el ácido, aforar a 50 ml. Guardar a 4°C.

15.- Acido acético 0.1 M NaCl 1.0 M.

Tomar 0.3 ml del ácido acético, pesar 2.99 g de NaCl, disolver en agua desionizada y aforar a 50 ml. Guardar a 4°C.

16.- Acido acético 0.1 M, NaCl 3.0 M.

Tomar 0.3 ml de ácido acético más 8.76 g de NaCl, disolver en agua desionizada y aforar a 50 ml. Guardar a 4°C.

17.- Buffer citrato-fosfatos 12.5 mM pH 3.8, NaCl 0.5 M.

A) Acido cítrico; FM. 192.1, pesar 0.4802 g disolver en agua desionizada y aforar a 100 ml. conc. final 25.0 mM.

B) Fosfato de sodio dibásico; FM. 358.157. Pesar 0.895 g disolverlos en agua desionizada y aforar a 100 ml. La conc. final es de 25.0 mM.

En el potenciómetro agregar [B] sobre [A] hasta llegar a pH 3.8. Pesar 1.0227 g de NaCl disolverlo en buffer citratos y aforar a 100 ml. La concentración final es de 12.5 mM del buffer. Guardar a 4°C.

18.- Urea 2.0 M.

Urea; FM. 60.059. Pesar 6.0 g, disolver en agua

desionizada y aforar a 50 ml. Guardar a T.A.

19.- Urea 4.0 M

Pesar 12.01 g. disolver en agua desionizada y aforar a 50 ml. Guardar a T.A.

20.- Clorhidrato de guanidina 1.0 M.

Clorhidrato de guanidina grado 1, anhidro; PM.

95.52. Pesar 4.77 g, disolver en agua desionizada y aforar a 50 ml. Guardar a 4°C.

21.- Clorhidrato de guanidina 2.0 M.

Pesar 9.552 g. disolverlos en agua desionizada y aforar a 50 ml. Guardar a 4°C.

22.- Clorhidrato de guanidina 4.0 M.

Pesar 19.10 g, disolverlos en agua desionizada y aforar a 50 ml. Guardar a 4°C.

23.- NaCl 1.0 M.

NaCl; PM. 58.44. Pesar 2.922 g disolverlos en agua desionizada y aforar a 50 ml. Guardar a 4°C.

24.- NaCl 3.0 M.

Pesar 8.76 g, disolver en agua desionizada y aforar a 50 ml. Guardar a 4°C.

25.- NaCl 5.0 M.

Pesar 14.61 g, disolverlos en agua desionizada y aforar a 50 ml. Guardar a 4°C.

26.- Buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5.

A) Carbonato de sodio; PM. 105.993. Pesar 21.19 g, disolverlos en agua desionizada y aforar a 100 ml.

B) Bicarbonato de sodio; PM. 84.01. Pesar 8.401 g,

disolverlos en agua desionizada y aforar a 100 ml.

En el potenciómetro añadir (B) a la solución (A) hasta llegar a pH de 9.5 tomar 5.0 ml de la solución anterior y aforar a 50 ml. la conc. final es de 0.1 M pH 9.5.

* Precipitación de inmunoglobulinas.

27.- Solución saturada de sulfato de amonio (SAS).

Pesar 750 g de sulfato de amonio, disolverlos en 1.0 l de agua desionizada (a saturación). Antes de usar ajustar el pH de la solución a 7.4 con NaOH 0.1 N. Almacenar a T.A.

28.- Buffer boratos 50 mM pH 8.5.

Acido bórico 0.2 M: PM. 61.8. Pesar 12.36 g, disolverlos en agua desionizada y aforar a 1.0 l.

Borax 0.05 M, equivale a 0.2 M de borato de sodio: PM. 381.4. Pesar 19.07 g, disolverlos en agua desionizada y aforar a 1.0 l.

Añadir el borax al ácido bórico hasta que el pH sea de 8.5. Tomar 250 ml y llevar a 1.0 l, la conc. final es de 50 mM a pH 8.5.

* Activación de la DEAE-celulosa.

29.- HCl 0.5 M.

Acido clorhídrico: PM. 36.46. Puerza 33.7%, tomar 20.9 ml de la solución concentrada, disolver en agua

desionizada y aforar a 500 ml. Almacenar a T.A.

30.- Fosfato monobásico de potasio 0.3 M.

Fosfato de potasio monobásico: PM. 136.091. Pesar 20.41 g., disolver en agua desionizada y aforar a 500 ml. Guardar a 4°C.

31.- NaOH 0.5 N.

Hidróxido de sodio: PM. 40.01. Pesar 20 g., disolverlos en agua desionizada y aforar a 500 ml. guardar a T.A.

32.- NaOH 0.05 N.

Tomar 100 ml de la solución de NaOH 0.5 N y aforar a 1.0 l. guardar a T.A.

* Purificación de IgG de conejo por cromatografía de intercambio iónico.

33.- Buffer fosfatos de sodio 17.5 mM pH 6.3.

A) Fosfato de sodio monobásico 0.7 M: PM. 137.99. Pesar 48.29 g., disolver en agua desionizada y aforar a 500 ml.

B) Fosfato dibásico de sodio 0.7 M: PM. 268.08. Pesar 93.83 g., disolver en agua desionizada y aforar a 500 ml.

En el potenciómetro añadir [B] sobre la solución [A] hasta llegar a pH de 6.3. Diluir 1:40 el buffer anterior. Preparar 2.0 l. Guardar a T.A.

34.- Buffer fosfatos de sodio 0.2 M pH 6.0.

A) Fosfato de sodio monobásico 0.7 M.

B) Fosfato de sodio dibásico 0.7 M.

La solución [A] se añade sobre la [B] hasta llegar a pH de 8.0. Diluir 1:3.5 con agua desionizada. Preparar 500 ml. Guardar a T.A.

* Conjugación de IgG de conejo a Sepharosa.

35.- Carbonato de sodio 2.0 M

Carbonato de sodio; PM. 105.993. Pesar 52.99 g, disolverlos en agua desionizada. Almacenar a T.A.

36.- Buffer carbonatos 1.0 M [Sol. base].

Bicarbonato de sodio; PM. 84.01. Pesar 42.0 g, disolverlos en agua desionizada y aforar a 500 ml.

Diluir el carbonato de sodio 1:2. En el potenciómetro se añade el carbonato al bicarbonato hasta llegar a pH 9.5. Y aparte se prepara otro buffer a pH 10.0. Guardar a 4°C.

37. Buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5.

Diluir 1:10 el buffer carbonatos 1.0 M pH 9.5. Guardar a 4°C.

38.- Buffer carbonatos 0.2 M pH 9.5.

Diluir 1:5 el buffer carbonatos 1.0 M pH 9.5.

39.- Buffer carbonatos 0.1 M pH 10.

Diluir 1:10 el buffer carbonatos 1.0 M pH 10. Guardar a 4°C.

40.- Buffer acetatos 0.1 M pH 4.0, NaCl 0.5 M.

Acetato de sodio 0.2 M; PM. 136.08. Pesar 2.761 g,

disolverlos en agua desionizada y aforar a 100 ml.

Acido acético glacial 0.2 M; PM. 60.05. pureza 99.7%. Tomar 5.7 ml y aforar a 100 ml con agua desionizada. Mezclar en el potenciómetro el acetato en el ácido acético hasta llegar a pH de 4.0.

Disolver el buffer 1:2 añadiendo 14.61 g de NaCl y aforar a 500 ml. Guardar a 4°C.

41.- Urea 2.0 M, NaCl 0.5 M.

Urea; PM. 60.06. Pesar 30.03 g, disolver el agua desionizada junto con 14.61 g de NaCl, aforar a 250 ml. Guardar a T.A.

42.- Bromuro de cianógeno 2.0 g/ml.

Añadir 50 ml de acetonitrilo al bote de 100 g de bromuro de cianógeno. La conc. final es de 2.0 g/ml. Guardar a -20°C

43.- Glicina 2.25 M.

Glicina; PM. 75.07. Pesar 8.44 g y disolverlos en buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5. Aforar a 50 ml. Guardar a 4°C.

* Conjugación de IgG de chivo anti-IgG de conejo a Peroxidasa.

44.- Buffer fosfatos 0.1 M pH 7.0. con Glutaraldehído al 1.25%.

Fosfato de sodio monobásico 0.7 M.

Fosfato de sodio dibásico 0.7 M.

Añadir al fosfato dibásico el fosfato monobásico hasta llegar a pH de 7.0. Tomar 0.72 ml del buffer más 0.25 ml de glutaraldehído al 25 % y aforar a 5.0 ml. Guardar a 4°C.

45.- NaCl 0.154 M.

NaCl: FM. 58.44. Pesar 0.9 g, disolverlos en agua desionizada y aforar a 100 ml. Guardar a 4°C.

46.- Buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5.

Usar el hecho para la activación de sepharosa.

47.- Lisina 0.2 M.

Lisina: FM. 162.65. Pesar 0.9132 g, disolverlos en buffer carbonatos 0.1M pH 9.5. y aforar a 25 ml. Guardar a 4°C.

* Ensayo inmunoenzimático.

48.- Buffer carbonatos 0.1 M pH 9.5.

Diluir 1:10 el buffer 1.0M pH 9.5.

49.- Gelatina 0.5%.

Pesar 0.125 g de gelatina y disolver en PBS, aforar a 25 ml. Preparar antes de usarse.

50.- PBS-Tween 20 al 0.05%. [PBS-T].

50 ml de buffer fosfatos 300 mM más 50 ml de NaCl 3.08 M más 0.5 ml de Tween 20. Mezclar y aforar a 1.0 l. Guardar a 4°C.

51.- Buffer citratos 0.32 M pH 6.2.

Ácido cítrico 0.32 M; PM. 152.1. Pesar 6.14 g.

disolverlos en agua desionizada y aforar a 100 ml.

Fosfato de potasio dibásico 0.32 M: PM. 141.965.

Pesar 9.23 g. disolverlos en agua desionizada y aforar a 250 ml. Mezclar en el potenciómetro añadiendo el fosfato al ácido cítrico hasta llegar a pH de 6.2. Guardar a 4°C.

52.-Sustrato revelador [op].

Se prepara en la oscuridad al momento de usarse.

Pesar 5.0 mg de o-fenilendiamina [op]. disolverlos en agua desionizada, añadir 120 µl de buffer citratos 0.32 M pH 6.2, más 100 µl de peróxido de hidrógeno al 1.2% [el peróxido de hidrógeno se prepara a partir del reactivo comercial que viene al 30%].

53.- Ácido sulfúrico 4.0 N.

Ácido sulfúrico: PM. 98.08, pureza 99.7%. Tomar 54.6 ml. disolverlos en agua desionizada y aforar a 500 ml. Guardar a T.A.

VIII BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Acosta G., Barranco C., Isibasi A., Campos A., Kumate J.. Excreción de anticuerpos de la clase IgA específicos anti-amiba en orina de ratas inmunizadas con trofozoítos de E. histolytica cultivadas en medio axénico.
Arch. Invest. Med. (Méx), 1982; 13 (supl 3): 255-259.
- 2.- Acosta G., Coto V., Isibasi A., Kumate J.
Anticueros anti-E. histolytica de la clase IgA en el calostro de mujeres mexicanas.
Inmunología 1985; 4: 24-27.
- 3.- Ahmao S., Khan H.M., Mandi AA., Kumar H.
Entamoeba histolytica antigens as possible vaccinogens
J. Chromatograph. 1968; 440: 467-472.
- 4.- Aley S., Scott WA., Conn ZA. Plasma membrane of E. histolytica
J. Exp. Med. 1980;152:391-404.
- 5.- Ali Khan Z., Meerovitch E. Studies on the purification of Entamoeba histolytica antigens by gel filtration. 1. Some physicochemical properties of the isolated fractions.
Can.J. Microbiol. 1970; 16:485-492.
- 6.- Alvarez Alba R., Loza Saldivar A. Frecuencia del absceso hepático amibiano en hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social de la república mexicana.
Arch. Invest. Med. (Méx). 1971;2(supl 1):327-332.
- 7.- Arakawa T., Timasheff SN. Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions.
Biochem. 1982; 21: 6545-6551.
- 8.- Arellano MT., Ortiz-Ortiz L.. Algunas propiedades de la inmunoglobulina específica del suero de pacientes con absceso hepático amibiano.
Arch. Invest. Med. (Méx.) 1974;5(supl2):467-470.
- 9.- Arroyo R., Orozco E.. Localization and identification of an Entamoeba histolytica adhesin.
Mol. Biochem. Parasitol. 1987; 23: 151-158.

- 10.- Atchley VO., Aurenheimer AH., Wasley MA.
Precipitate patterns in agar gels with sera from
human amebiasis and Entamoeba histolytica antigen.
J. Parasitol. 1963; 49:313.
- 11.- Aust-Kettis A., Thorstensson R., Goran U. Antigenicity
of E. histolytica strain NIH-200: A survey of
clinically relevant antigenic components.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 1983; 32:512-522.
- 12.- Aust-Kettis A., Thorstensson R., Sundrist KG.
Dynamics of the interaction between Entamoeba
histolytica and components of the immune response.
III fate antibodies after binding of the cell
surface.
Scand. J. Immunol. 1981; 13:473-481.
- 13.- Avila EE., Sanchez-Garza M., Calderon J. Entamoeba
histolytica and E. invadens: Sulfhydryl-dependent
proteolytic activity.
J. Protozool. 1985; 32:163-166.
- 14.- Beaver PC., Jung RC., Cupp EW., Clinical Parasitology
1984 9a. ed. Lea & Febiger Philadelphia USA. pp101-
139.
- 15.- Becker I., Perez-Tamayo R., Montfort A., Alvizouri
AM., Perez Montfort R. Entamoeba histolytica: Role of
amebic proteinases and Polymorphonuclear leukocytes
in acute experimental amebiasis in the rat.
Exp. Parasitol. 1988; 67: 268-280.
- 16.- Calderon J.. The role of complement in host
defense against Entamoeba histolytica. En
Amebiasis. Human Infection by E. histolytica.
Ravidin JL., John Wiley & Sons USA. pp 453-463.
- 17.- Calderon J., Munoz ML., Acosta H. Surface
redistribution and release of antibody-induced cap
in Entamoeba.
J. Exp. med. 1980; 151: 184-193.
- 18.- Calderon J., Schreiber RD. Activation of the
alternative and classical complement pathways by
E. histolytica
Infect. Immun. 1985; 50: 560-563.
- 19.- Calderon J., Tovar GR. Loss of susceptibility to
antibody and complement mediated lysis in Entamoeba
histolytica.
Arch. Invest. Med. (Mdx). 1980; 11(supl 1):241-244.

- 20.- Calderon J., Tovar GR. Loss of susceptibility to complement lysis in E. histolytica HM1 by treatment with human serum.
Immunol. 1980; 58: 467-471.
- 21.- Campoell DH., Garvey J., Natalie EC., Sussfort DA. Methods in Immunology. 1964. W.A. Benjamin Inc. USA.
- 22.-Capin R., Capin NR., Carmona M., Ortiz L. Effect of complement depletion on the induction of amebic liver abscess in the hamster.
Arch. Invest. Med. (mex) 1980; 11(sup11):173-180.
- 23.- Cervantes MA. Estudios del ciclo vital del oógeno Entamoeba. tesis de M. en C. Cinvestav 1981.
- 24.- Chadee K., Meerovitch E., The pathogenesis of experimental induced amebic abscess in the gerbil (Meriones unguiculatus).
Ann. J. Pathol. 1984; 117:71-80.
- 25.- Chang SM., Lin CM., Dusanic D., Cross JH., Antigenic analyses of two axenized strains of E. histolytica by two-dimensional electrophoresis.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 1979; 28:845-853.
- 26.- Diamond LS. Axenic cultivation of Entamoeba histolytica.
Science. 1961; 134:336.
- 27.- Diamond LS., Harlow DR., Cunnik CC. A new medium for axenic cultivation of E. histolytica and others Entamoeba.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. 1978; 72:431.
- 28.- Diamond LS., Harlow DR., Phillips BP., Keister DB. Entamoeba histolytica iron and nutritional immunity.
Arch. Invest. Med. (Méx) 1978;9(sup11):329-338.
- 29.-Davis KA., Hatofi Y. Succinate Dehydrogenase. I. Purification, molecular properties and substrate.
Biochem. 1971;10: 2509-2510.
- 30.-Davis KA., Hatofi Y. Kinetics of the resolution of complex I (Reduced diphosphopyridine nucleotide-coenzyme Q reductase) of the mitochondrial electron system by chaotropic agents.
Biochem. 1989; 8: 3355-3361.

- 31.-Ernest PB., Underdown BJ., Blenestock J. Inmunidad en tejidos mucosos. En Stites DP., Stood JD., Weil JV. Inmunología básica y clínica. El Manual moderno 1988. p 156-163.
- 32.- Fuchs G., Ruiz FG., Pickering LK. Amebiasis in the pediatric population. En Ravdin JI. Amebiasis, human infection by E. histolytica. 1988 John Wiley & Sons USA. 664-704.
- 33.- Gandhi MB., Irshad M., Acharya SK., Nath TB. Amebic liver abscess and circulating immune complexes of Entamoeba histolytica proteins. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1988; 39:440-444.
- 34.- Garcia TF., Hashimoto YB., Kumate J. Proteínas propias y de medio de cultivo en los trofozoitos de E. histolytica obtenidos axénicamente. Arch. Invest. Med. (Méx), 1980; 11(supl.1):159-162.
- 35.- Gharidian E., Meerovitch E. Macrophage requirement for host defense against experimental hepatic amebiasis in the hamster. Parasite. Immunol., 1982; 4:219-225
- 36.- Gharidian E., Meerovitch E., Kongshaun PAL. Role of macrophages in host defense against hepatic amebiasis in hamster. Infect. Immun., 1983; 42:1017-1029.
- 37.- Goldman M. Evaluation of a fluorescent antibody test for amebiasis using two widely differing ameba strain as antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1966; 15:694.
- 38.-Goldman M., Carver RK. Antigenic analysis of Entamoeba histolytica by means of fluorescent antibody. III. Reaction of the Laredo strain with five anti-histolytica sera. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1962; 11: 341-346.
- 39.- Grundy MS., Cartwright-Taylor., Lundin L., Thors C. Huidt G. Antibodies against Entamoeba histolytica in human milk and serum in Kenya. J. Clin. Microbiol., 1983; 17: 753-758.
- 40.-Guerrant RL., Brush J., Ravdin JI. Interaction between Entamoeba histolytica and human polymorphonuclear neutrophils. J. Infect. Dis., 1981; 143: 83-93.

- 41.-Hanstein WG., Davis KA., Ghalamir MA., Hafeti Y.
Succinate dehydrogenase II. Enzymatic properties.
Biochem., 1971; 10: 2517-2524.
- 42.-Harold WB., Franklin AN. Basic clinical
parasitology. 1983 5a. ed. Appleton Century-Crofts
USA. p 23-54.
- 43.-Hafeti Y., Hanstein WG. Destabilization of
membranes with chaotropic ions.
Methods Enzymol. 1974;V.31: 770-790.
- 44.-Healy GR. Immunologic tools in the diagnosis of
amebiasis: Epidemiology in the United States.
Rev. Infect. Dis., 1986; 8: 239-246.
- 45.- Healy GR. Diagnostic techniques for stool samples.
En Ravdin JI. Amebiasis, infection human by
Entamoeba histolytica 1988. John Wiley & sons NY.
USA. pp.635-649.
- 46.- Healy GR. Serology. En Ravdin JI. Amebiasis, human
infection by Entamoeba histolytica 1988. John Wiley
& sons NY. USA. pp.650-663.
- 47.- Healy GR., Visvesvara GS., Kogan Iq. Observations
on the persistence of antibodies to E. histolytica.
Arch. Invest. Med. (Méx), 1974; 5(supl.2):495-500.
- 48.- Huidt G., Davies P., Allison A. et. al.
Interaction between Entamoeba histolytica and
complement.
Nature, 1979; 277: 214-216.
- 49.- Jimenez CE., Olivera SJ., Kumate J., Ortiz B.
Purificación parcial de algunos antígenos de
superficie de E. histolytica. Investigación de la
actividad biológica frente a sueros de pacientes
con absceso hepático amebiano.
Arch. Invest. Med. (Méx), 1982;13(Supl 3):281-289.
- 50.- Joyce MP., Ravdin JI. Antigens of E. histolytica
recognized by immune sera from liver abscess
patients.
AM. J. Trop. Med. Hyg., 1988; 38: 74-80.
- 51.- Kabat EA., Mayer MM. Experimental immunochimistry.
Charles Thomas Publications 2a. ed. 1971. USA. Cap.
10. Cross reactions pp. 405-444.

- 52.- Katzenstein D., Rickerson V., Brande A. New
consents to amebic liver abscess derived from
hepatic imaging, serodiagnosis, and hepatic enzymes
in 67 consecutive case in San Diego.
Medecine., 1982; 61: 237.
- 53.- Keene WE., Pettitt MG., Allen S., Mckerrow JH. The
major neutral proteinase of Entamoeba histolytica.
J. Exp. Med., 1986; 163: 536-547.
- 54.- Kessel JF., Lewis WF., Kim H. Preliminary report
on a hemagglutination test for Entamoeba.
Proc. Soc. Expe. Biol. Med., 1961; 106: 409.
- 55.- Kobiler D., Mirelman D. Adhesion of Entamoeba
histolytica trophozoites to monolayers of human
cells.
J. Infect. Dis., 1981; 144:539-546.
- 56.- Kretschmer R. Immunology in Amebiasis. En
Martinez Palomo A. Amebiasis. 1986 Elsevier
Amsterdam. pp. 95-166.
- 57.- Kretschmer R., Lopez OM. Estudios sobre a
inmunidad celular con antígeno amibiano ajenico y
sus fracciones.
Arch. Invest. Med. (Méx)., 1971; 2(supl):269-274.
- 58.- Krupp IM., Definition of the antigenic pattern of
Entamoeba histolytica, and immunoelectrophoretic
analysis of the variation of patient response to
amebic disease.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1977; 26: 387-392.
- 59.- Laguna J. Bioquímica. 2a. ed. 1970. La Prensa
Médica Mexicana. pp.322.
- 60.- Lasic DD., Los liposomas. Mundo científico. 1989; 95:
974-983.
- 61.- Lee E., Palacios D., Kretschmer R. Localización
del anticuerpo antiamebiano en las inmunoglobulinas
del suero humano.
Arch. Invest. Med. (Méx)., 1970;1(supl 1):s101-
s106.
- 62.- Lenninger AL. Principles of biochemistry. Worth
Publisher Inc. 1982 USA. Cap. 12 Lipids and
membranes. pp. 303-329.

- 63.- Li E., Becker A., Stanley SC. Use of chinese hamster ovary cells with altered glycosylation patterns to define the carbohydrate specificity of Entamoeba histolytica adhesion.
J. Exp. Med., 1988;167: 1725-1730.
- 64.- Lievano AM., Roman M., Avila EE., Calderon J. Especificidad de los anticuerpos contra E. histolytica en pacientes con amebiasis hepática. 1986. XII Congreso nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Jalapa Veracruz, México. .
- 65.- Long KS., Fischer KG., Hysmith RM., Ravdin JI. Phospholipase A enzymes of Entamoeba histolytica: description a subcellular localization.
J. Infect. Dis. 1985; 152: 536-541.
- 66.- Lowry DH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem.. 1951; 193: 265-275.
- 67.- Luaces AL., Barrett AJ. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of Entamoeba histolytica.
J. Biochem. 1988;250: 903-909.
- 68.- Lushbaugh WB., Hofbaver AF., Pittman FE. Entamoeba histolytica: Purification of Cathepsin B.
Exp. Parasitol., 1985; 59: 328-334.
- 69.- Madison SE., Kagan IG., Norman L. Reactivity of human immunoglobulins in amebiasis.
J. Immunol. 1968; 100: 217-220.
- 70.- Madison SE., Powell SJ., Elsdon DR. Comparison to hemagglutinins and precipitins in amebiasis.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1965; 14: 551.
- 71.- March SC., Parikh I., Cuatrecasas P. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography.
Anal. Biochem., 1974; 60:149-152.
- 72.- Martinez Palomo A. The biology of Entamoeba histolytica. 1982 Academic Press USA.
- 73.- Martinez Palomo A. Amebiasis 1986. Elsevier Amsterdam The Netherlands.

- 74.-Martínez Palomo A. The pathogenesis of E. histolytica.
Parasitol. today., 1987; 3: 111-118.
- 75.- Mason DP.. Apter FIC. Mason's tropicals diseases.
18 ed. Bailliere Tindall London 1983. pp. 121-147.
- 76.- Mathews HM.. Moss DM.. Visvesvara GS. Analysis of
antigens from membrane and soluble fractions of E. histolytica.
J. Protozool., 1986; 33: 328-334.
- 77.-Meza I., Cazares F., Rosales-Encina JL., Talamas
RP., Rodjkin M. Use of antibodies to characterize a
220-kilodalton surface protein from Entamoeba histolytica.
J. Infect. Dis., 1987; 156: 798-805.
- 78.-Meza I., Sabanero M., Cazares F. Isolation and
characterization of actin from E. histolytica.
J. Biochem. Biol., 1983; 258:3396.
- 79.- Mohimem A., Maitra TK., Jalan KN., Menra S. A
specific solid-onase assay for the detection of
immune complexes containing Entamoeba histolytica
antigens.
J. Immunol. Methods. 1989; 117: 39-44.
- 80.- Montoya A., Castell JE. Long-term storage of
peroxidase-labelled immunoglobulins for use in
enzyme immunoassay.
J. Immunol. Methods., 1987; 99: 13-20.
- 81.-Muñoz ML., Acosta VH., Calderon J. Redistribucion
de antigenos superficiales de Entamoebae y su
caracterizacion immunoquimica.
Arch. Invest. Med. (Mex).1978;9(sup11):183-190.
- 82.- Muñoz ML., Calderon J., Rodkind M. Presencia de
actividad colagenolitica en trofozoitos de
Entamoeba histolytica.
Arch. Invest. Med. (Mex) ., 1982;3(sup13):191-202.
- 83.- Murray MJ., Murray A., Murray CJ. The salutary
effect of milk on amebiasis and its reservae by
iron.
Br. Med. J.,1980; 280: 1351-1352.

- 84.- Noya Gonzalez O., Warren LG., Gond R. Serum proteins in the plasma membrane of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx) ., 1980;11(sup11):109-114.
- 85.- Olsen WO. Animal parasites their life cycles and ecology 3a. ed. 1974. University Park Press. USA. pp.75-84.
- 86.- Orozco ME., Guarneros G. Martinez PA. Clonas de E. histolytica deficientes en fagocitosis presentan deficiencia en virulencia. Arch. Invest. Med. (Méx) ., 1982;13(sup13):137-143.
- 87.-Orozco ME., Guarneros G., Martinez PA., Sanchez T. Entamoeba histolytica phagocytosis as a virulence factor. J. Exp. Med. 1983; 158: 1511-1521.
- 88.-Orozco ME., Martinez PA., Gonzalez RA., Guarneros G., Mora GJ. Las interacciones entre lectina y receptor median la adherencia de E. histolytica a células epiteliales. Relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. Arch. Invest. Med. (Méx) ., 1982;13(sup13):159-167.
- 89.- Orozco ME., Martinez PA., Guarneros G. Virulencia y propiedades de superficie de varias cepas axénicas de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx) ., 1980;11(sup11):153-157.
- 90.- Ortiz DL., Capin R. Capin NR. Activation of the alternative pathway of complement by Entamoeba histolytica. Clin. Exp. immunol.. 1978; 34:10.
- 91.- Ortiz DL., Sepulveda B., Chevez A. Nuevos estudios acerca de la acción de sueros humanos normales e inmunes sobre el trofozoito de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx) ., 1974;5(sup12):337-342.
- 92.-O'shea Alvarez MS., Trevino-Garcia MN. Presencia de anticuerpos antiamebianos en secreciones de ileon, colon y materia fecal en pacientes con absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Med. (Mex). 1985;16: 401-409.
- 93.-Ostoa-Saloma P., Cabrera N., Becker I., Perez Montfort R. Proteinases of Entamoeba histolytica associated with different subcellular fractions. Mol. Biochem. Parasitol.. 1989;32: 133-144.

- 94.- O'Sullivan MJ., Marks V. Methods from the preparation of enzyme-antibody conjugates for use in enzyme immunoassay.
Methods Enzymol. 1981; 73: 147-166.
- 95.- Palacios O., de la Hoz R., Sosa R. Determinación de antígeno amibiano en heces por el método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para la identificación de Entamoeba histolytica.
Arch. Invest. Med. (Méx.). 1978; 9(supli): 337-348.
- 96.- Patterson M., Healy GR., Shabat JM. Serologic testing for amebiasis.
Gastroenterol., 1980; 78: 136-141.
- 97.- Feneisky HS., Tzagoloff A., Extraction of water-soluble enzymes and proteins from membranes.
Methods Enzymol., 1971; 22: 204-219.
- 98.- Perez Montfort R., Ostoa-Saloma P., Velazquez M., Montfort I., Becker P. Catalytic classes of proteinases of Entamoeba histolytica.
Mol. Biochem. Parasitol., 1987; 26: 87-96.
- 99.- Perez Tamayo R. Pathology of Amebiasis. En Martinez Palomo A. Amebiasis. 1986 Elsevier Amsterdam The Netherlands. pp. 44-94.
- 100.- Petri WA., Champan MD., Snodgrass T., Mann EJ., Broman J., Ravdin JI. Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica.
J. Biol. Chem. 1989; 264: 3007-3012.
- 101.- Pillai S., Mohimem A. A solid-phase Sandwich radioimmunoassay for Entamoeba histolytica proteins and the detection for circulating antigens in amoebiasis.
Gastronterol., 1982; 83: 1210-1216.
- 102.- Pillai S., Mohimem A., Mehra S. A radioimmuno precipitation polyethylene glycol assay for circulating Entamoeba histolytica antigens.
J. Immunol. Methods. 1982; 55: 273-276.
- 103.- Pinto da Silva P., Martinez PA., Gonzalez RA. Membrane structure and surface coat of Entamoeba histolytica. Topochemistry and dynamics of the cell surface: Cap formation and microexudate.
J. Cell. Biol. 1975; 64: 538-550.

- 104.- Plaut AG., Can we diagnose amebiasis?
Gastroenterol. 1982; 83: 1319-1321.
- 105.- Forath J., Kristiansen T. Biophysic affinity chromatography and related methods. En Neurath H., Hill RL. proteins V. 1. 3a. ed. 1975 Academic Press. USA. pp. 114-169.
- 106.- Powell SJ. the capillary tube precipitin test. A rapid serologic aid to clinical diagnosis in invasive amebiasis.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 1968; 17: 840.
- 107.- Prathap K., Gilman R. The histopathology of acute intestinal amebiasis. A rectal biopsy study.
Am. J. Pathol., 1970; 60: 229-245.
- 108.- Ralls FW., Colletti PM., Halls JM. Imaging in hepatic amebic abscess. En Ravdin JI. Amebiasis, human infection by Entamoeba histolytica. 1988. John Wiley & sons USA. pp. 604-704.
- 109.- Ravdin Jonathan I. Pathogenesis of disease caused by Entamoeba histolytica: Studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis.
Rev. Infect. Dis., 1986; 8: 247-260.
- 110.- Ravdin Jonathan I. Amebiasis, human infection by Entamoeba histolytica. 1988. John Wiley & sons N.Y. USA.
- 111.- Ravdin Jonathan I. Entamoeba histolytica: from adherence to enteropathy.
J. Infect. Dis., 1989; 159: 420-429.
- 112.- Ravdin JI., Croft BY., Guerrant RL. Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica.
J. Exp. Med., 1980; 152: 377-390.
- 113.-Ravdin JI., Guerrant RL. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica.
J. Clin. Invest., 1981; 68: 1305-1313.
- 114.- Ravdin JI., Jones TC. Entamoeba histolytica. Amebiasis. En Mandell GL., Douglas RG., Benett JE. principles and practice of infectious diseases. 1985. 2a. ed. pp. 1506-1512.

- 115.- Ravdin JI., Murphy CF., Guerrant RL., Long-Krug SA. Effect of calcium and the phospholipase A antagonists in the cytopathogenicity of Entamoeba histolytica.
J. Infect. Dis., 1965; 152: 542-549.
- 116.- Ravdin JI., Murphy CF., Salata RA., Guerrant RL., Hewlett EL. N-acetyl-D-galactosamine-inhabitable adherence lectin of Entamoeba histolytica. I. Partial purification and relation of amoebic virulence IN VITRO.
J. Infect. Dis., 1985; 151: 804-815.
- 117.- Reed SL. Braude AI. Extraintestinal disease: Clinical syndromes, diagnostic profile, and therapy. En Ravdin JI. Amebiasis, human infection by Entamoeba histolytica. 1988. John Wiley & sons. NY. USA. pp. 511-532.
- 118.- Reed SL., Gault M., Gillin FD., et.al. Interaccion de Entamoeba histolytica patogena y no patogena con el complemento humano.
Arch. Invest. Med. (Mex) , 1987; 18: 141-149.
- 119.- Reed SL., Keene WE., Mc Kerrow JH., Gigli I. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of Entamoeba histolytica.
J. Immunol. 1989; 143: 189-195.
- 120.- Reed SL., Sargeant PG., Braude AI. Resistance to lysis by human serum of pathogenic Entamoeba histolytica.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1983; 77: 234-253.
- 121.- Rivera P., Carabez-Trejo A., Cortes LF., Isibasi A., Kumate J. Caracterización inmunológica de antígenos propios y del medio de cultivo en las membranas plasmáticas de Entamoeba histolytica.
Arch. Invest. Med. (Méx) , 1984; 15: 405-411.
- 122.- Rosales-Encina JC., Meza I., Lopez de Leon A., Talamas Roham P., Rojkind M. Isolation of a 220-Kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of Entamoeba histolytica.
J. Infect. Dis., 1987; 156: 790-797.
- 123.- Ross GW., Knight R. Dietary factors affecting the pathogenicity of E. histolytica in rats.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1973; 67: 560-567.

- 124.-Salata RA., Cox JG., Ravdin JI. The killing of virulent Entamoeba histolytica trophozoites by cytotoxic lymphocytes.
Clin. Res., 1984; 32: 365.
- 125.-Salata RA., Cox JG., Ravdin JI. The interaction human T lymphocytes and Entamoeba histolytica: Killing of virulent amoebae by lectin-dependent lymphocytes.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1987; 9: 249-261.
- 126.- Salata RA., Martinez PA., Murray HW., Canales L. Trevino N., Segovia E., Murphy C., Ravdin JI. Patients treated for amoebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective IN VITRO against Entamoeba histolytica.
J. Immunol., 1986; 136: 2633-2639.
- 127.- Salata RA., Murray H., Rubin BY., Ravdin JI. The role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for Entamoeba histolytica trophozoites.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1987; 37: 72-78.
- 128.- Salata RA., Pearson RD., Ravdin JI. Interaction of human leukocytes and Entamoeba histolytica: killing of virulent amoeba by activated macrophage .
J. Clin. Invest., 1985; 76: 497-499.
- 129.-Salata R., Ravdin JI. N-acetyl-D- galactosamine-inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica. II. Mitogenic activity for human lymphocytes.
J. Infect. Dis. 1985; 151: 816-822.
- 130.- Salata RA., Ravdin JI. Review of the human immune mechanisms directed against Entamoeba histolytica.
Rev. Infect. Dis., 1986; 8: 241-270.
- 131.- Salata RA., Ravdin JI. The interaction of human neutrophils and Entamoeba histolytica increases cytopathogenicity for liver cell monolayers.
J. Infect. Dis., 1986; 154: 19-22.
- 132.- Salata RA., Ravdin JI. Human cell-mediated immune mechanisms directed against Entamoeba histolytica. In Ravdin JI. Amoebiasis, human infection by Entamoeba histolytica. 1 ed. Linn Wiley & sons NY. USA. pp. 471-477.

- 133.- Sanchez MN., Garcia Tamayo F., Kumate J. Inmunoquímica de proteínas inmunogénicas de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx). 1978;9(suol1):141-154.
- 134.- Sargeaunt FG. Zymocemes of E. histolytica. En Ravdin JI. Amebiasis, human infection by Entamoeba histolytica. 1988. John Wiley & sons NY. USA. pp.370-387.
- 135.-Sargeaunt FG., Williams JE., Grene JD. The differentiation of invasive and non-invasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1978; 72: 519-521.
- 136.- Schneider CR., Gordon.. RM. The effect of medium components on the specificity of axenic Entamoeba histolytica antigen. J. Parasitol., 1968; 54: 711-714.
- 137.- Scholze H., Werries E. A weakly acidic protease has a powerful proteolytic activity in Entamoeba histolytica. Mol. Biochem. Parasitol., 1984; 11: 293-300.
- 138.- Schulte W., Scholze H., Werries S. Specificity of a cystein proteinase of Entamoeba histolytica towards tna alfa-ICB2 peptide of bovine collagen type I. Mol. Biochem. Parasitol., 1987; 25: 39-43.
- 139.- Sepúlveda B. Amebiasis: Host-pathogen biology. Rev. Infect. Dis., 1982; 4: 836-842.
- 140.- Sepúlveda B., Lee E., de la torre M., Landa L. El diagnóstico serológico de la amebiasis invasora con la técnica de inmunolectroforesis cruzada. Arch. Invest. Med. (Méx)., 1971; 2(supl 1):263-268.
- 141.- Sepúlveda B., Martinez PA. Amebiasis. en Warren KS., Mahmoud AF. Tropical and geographical medicine. Mc. Graw Hill 1984. pp 305-318.
- 142.-Sepúlveda B., Tanimoto WM., Calderon P., de la Torre M. Neutralización de la virulencia en cultivos de E. histolytica con suero immune. Arch. Invest. Med. (Méx)., 1974;5(sup11):s451-s456.

- 143.- Sepúlveda E., tanimoto WM., Calderon P., de la Torre M. Inducción de la inmunidad pasiva antiambiiana en el hamster por la inyección del suero inmune.
Arch. Invest. Med. (Méx)., 1974;5(supl1):s451-s456.
- 144.- Sodeman WA., Dowda MC. Rapid serological methods for the demonstration of Entamoeba histolytica.
gastroenterol., 1978; 65: 604.
- 145.- Souzu Hiroshi. Studies on the damage to Escherichia coli cell membrane caused by different rates to freeze-thawing.
Biochem Biophys. Acta., 1980; 603: 13-26.
- 146.- Torre M. de la., Ortiz OL., de la Hoz M. Sepulveda B. Acción de suero humano inmune y de las gammaglobulinas antiambiida sobre cultivos de E. histolytica.
Arch. Invest. Med. (Méx)., 1973;4(supl):s67-s70.
- 147.- Trissl D. Immunology of Entamoeba histolytica in human and animals host.
Rev. Infect. Dis., 1982; 4: 1154-1184.
- 148.- Trissl D., Martinez PA., de la Torre M., et. al. Surface properties of Entamoeba: Increase rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains.
J. Exp. Med., 1978; 48: 1137.
- 149.- Trissl D., Muller R., Ries R., Rathmann M. Anti-surface antibodies to Entamoeba histolytica and their role in complement lysis.
Arch. Invest. Med. (Méx)., 1986;17(supl1):203-208.
- 150.- Tsutsumi V., Mena LP., Anaya VF., Martinez PA. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation.
Am. J. Pathol., 1984; 117: 81-97.
- 151.- Vinayak VK., Purnima Sink et al. Specific circulating immune complexes in amoebic liver abscess.
J. Clin. Microbiol. 1986; 23: 1086-1095.
- 152.- Voiler A., Barlett A., Bidwell DE. Enzyme immunoassay for parasitic diseases.
Trans. R. Trop. Med. Hyg., 1976; 70: 98.

- 153.- Voller A., Bidwell DE. Enzyme-linked immuno sorbent assay. En Rose Friedman H., Fahey JL. Manual of clinical laboratory immunology. 1986. 3a. ed. American society for Microbiology. Washintong DC. USA. pp. 99-109.
- 154.- Walsh JA. Prevalence of Entamoeba histolytica infection. en Ravdin JI. Amebiasis, human, infection by Entamoeba histolytica. 1988. John Wiley & sons. NY. USA. pp 93-105.
- 155.- Weir DM. Handbook of experimental immunology. 3a. ed. V. I. 1978. Alden Press. England.
- 156.- Williams CA., Chase MW. Methods in immunology and immunochemistry. V. I. 1967. Academic Press USA.
- 157.- World Health Organization (1969), Amebiasis. Report of a WHO Expert comittee W.H.O. Tech-Ser No. 421.
- 158.-Zuluaga H., Botero D., Restrepo M. Parasitosis intestinales y genitales por protozoos. En Botero D., Restrepo M.Parasitosis humanas 1984. Ed. Corporación para la Investigación Biológica. Colombia. pp. 21-68.