



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

DEMOSTRACION DE LA REACCION INMUNOLOGICA
DEL SUERO ANTIAMIBIANO CON ANTIGENOS
DE SUPERFICIE DE E. histolytica POR METODOS
INMUNOQUIMICOS.

264

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A

María del Socorro O'shea Alvarez

MEXICO, D. F.

1974



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS Tesis 246
ADE 1974
FECHA
PROG Mit. 247



QUIMIO

DEMOSTRACION DE LA REACCION INMUNOLOGICA DEL SUERO
ANTIAMIBIANO CON ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE E. HIS-
TOLYTICA POR METODOS INMUNOQUIMICOS.

MA. DEL SOCORRO O'SHEA A.

ASESOR: C. PROF.Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA.

ASESOR TECNICO: DR. ALFREDO FERIA VELASCO.

JURADO ASIGNADO OFICIALMENTE:

PRESIDENTE: Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA

VOCAL: Q.F.B. ERNESTINA BALLESTEROS

SECRETARIO: Q.F.B. SOCORRO CAO

1er. SUPLENTE: Q.F.B. DEA CORONADO

2do. SUPLENTE: Q.F.B. GUILLERMO RENDON

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA,
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, C.M.N
SECCION DE NEUROBIOLOGIA Y NEUROLOGIA.

SUSTENTANTE: MARIA DEL SOCORRO O'SHEA ALVAREZ.

ASESOR DEL TEMA: Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA.

SUPERVISOR TECNICO: DR. ALFREDO FERIA VELASCO.

A MIS PADRES:

CON TODO MI CARIÑO Y AGRADECIMIENTO.

A MI HERMANO.

A MI SOBRINA.

MI PARTICULAR AGRADECIMIENTO AL
DR. ALFREDO FERIA VELASCO POR
LA DIRECCION DE ESTE TRABAJO.

MI AGRADECIMIENTO SINCERO A TODAS
LAS PERSONAS QUE DESDE EL INICIO
DE MI CARRERA, SE HAN PREOCUPADO
POR MI Y ME HAN PRESTADO SU AYUDA
DESINTERESADA, ES A ELLOS A QUIE-
NES DEDICO DESDE AHORA MI VIDA PRO-
FESIONAL.

GRACIAS.

A G R A D E C I M I E N T O S .

DR. HECTOR GOMEZ ESTRADA

DR. RUBEN MARTINEZ PEREZ

BIOL. JORGE ARELLANO

DR. ROBERTO KRETSCHMER

Q.F.B. MARGARITA DE LA TORRE

POR SU AYUDA EN LA ELABORACION

DE ESTE TRABAJO.

A JONHNY:

POR SU INSUSTITUIBLE CARIÑO.

I N D I C E

	F
INTRODUCCION	
I.- GENERALIDADES	1
II.- MATERIAL Y METODOS	6
III.- RESULTADOS	37
IV.- DISCUSION Y RESUMEN	43
V.- CONCLUSIONES	60
VI.- BIBLIOGRAFIA	62

I N T R O D U C C I O N:

Existen numerosos trabajos en los que se describen los aspectos estructurales de los trofozoitos de E. histolytica con microscopía óptica y electrónica.

Otros estudios se refieren a la identificación de antígenos en los trofozoitos por métodos inmunológicos y son escasos aquellos que se refieren a la localización estructural de éstos; ninguno desde el punto de vista inmunocitoquímico para microscopía electrónica. El presente tiene como objeto demostrar los sitios activos de antigenicidad de superficie en los trofozoitos de la E. histolytica por métodos inmunocitoquímicos a nivel de microscopía óptica y electrónica.

CAPITULO I

GENERALIDADES

La amibiasis es una enfermedad de elevada frecuencia que afecta particularmente a la población más pobre y que predomina en las zonas de mayor aglomeración en las cuales las condiciones de higiene son inadecuadas.

La amibiasis ocupa el sexto lugar en frecuencia en las enfermedades consideradas como causa directa de muerte (1). Además se asocia a otros padecimientos como diabetes mellitus, tuberculosis pulmonar, tromboembolias, micosis oportunistas y cirrosis hepática (2).

Es una enfermedad que se encuentra distribuida en todo el mundo pero de preferencia en los países situados entre los trópicos y los climas templados (2). En 1968 Elsdon-Dew hizo una estimación de la distribución geográfica de la amibiasis y concluyó que México es el país con mayor morbi-letalidad en el continente americano (3).

Esto da una idea de la importancia que tiene llevar al cabo estudios en nuestro medio de dicha enfermedad para su posible prevención y curación adecuadas. Para ello es importante tener un mayor conocimiento sobre la estructura anatómica de la Entamoeba histolytica, sobre su biología y sobre las relaciones huésped-parásito.

La acción patogénica de la Entamoeba histolytica (Fig. 1) es muy variable y determina la formación de granulomas y absceso con mínima reacción inflamatoria (4). Los trofozoitos viven generalmente en el intestino grueso del hombre pero en ocasiones puede invadir otros órganos como el hígado, cerebro, pulmones, bazo y piel. De éstos la localización predominante es el hígado donde produce absceso hepático el cual es más frecuente en adultos de 56 años (1).

La mortalidad por amebiasis ocurre en aquellos casos en que la Entamoeba histolytica adquiere un comportamiento invasor dentro del organismo. Este a su vez estaría determinado por las características de patogenicidad del propio parásito y condicionado a una respuesta inmune inadecuada hacia la ameba.

En los últimos años se han tomado diferentes medidas sanitarias y terapéuticas para tratar de controlar la morbilidad y mortalidad producida por amebiasis con éxito relativo. La mayoría de los autores están de acuerdo que si se pudiera prevenir la enfermedad de manera adecuada, se reduciría grandemente la complejidad del problema. A este respecto es preciso mencionar que las principales medidas preventivas serían: a) aumentar las condiciones de higiene de la población y b) tratar de inducir inmunidad antiamebiana posiblemente mediante la aplicación de una vacuna antiamebiana.

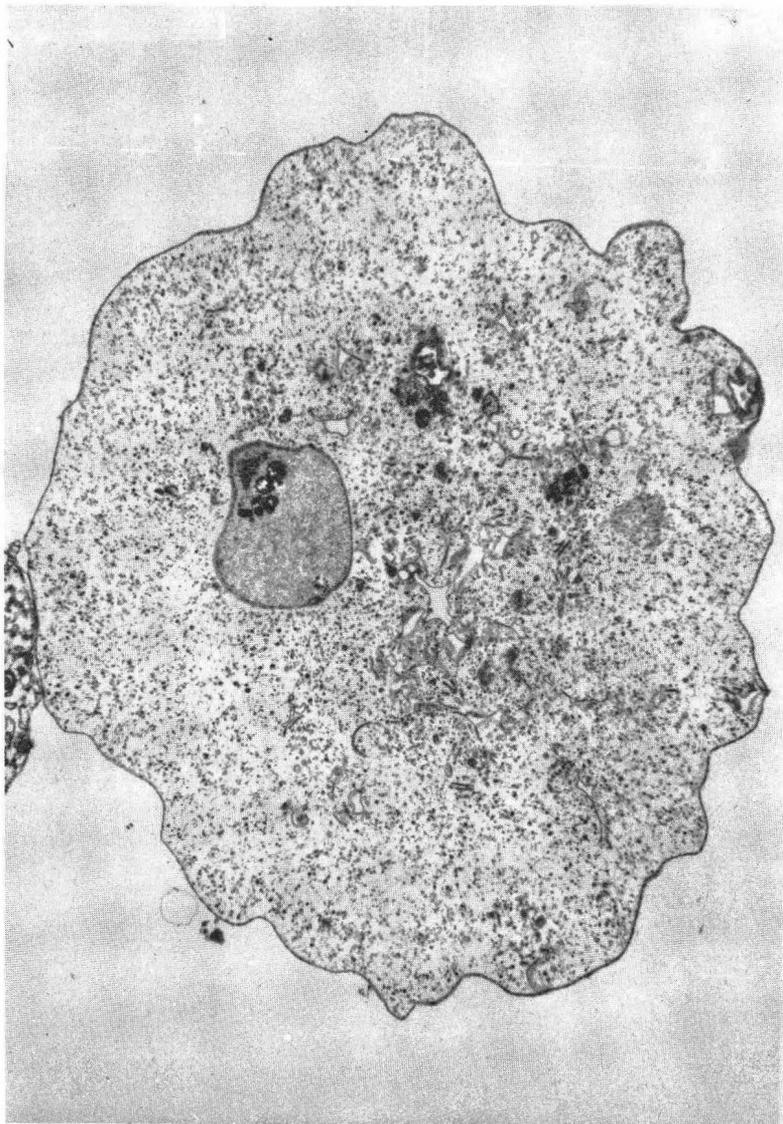


FIG. No. 1.- Trofozoito de Entamoeba histolytica cultivado axénicamente (4,200 x).

(Cortesía de los doctores Alfredo Feria y Norberto Treviño: J. Protozool. 19:200-211, 1972).

Las características que permiten a la Entamoeba histolytica producir una enfermedad endémica de alta patogenicidad se deriva de su propio ciclo biológico y constitución citoquímica. Sin embargo los mecanismos inmunológicos de defensa contra ella han sido poco estudiados.

Los datos que se tienen al respecto están principalmente relacionados con el diagnóstico. En 1927 Craig se basó en la existencia de anticuerpos antiamibianos en el suero de pacientes con amibiasis para llevar al cabo reacciones de fijación de complemento (5). Se han utilizado también otras pruebas serológicas como precipitación, inmunoelectroforésis contra inmunoelectroforésis, reacciones intradérmicas y con menor frecuencia reacciones de inmunofluorescencia (6-14). Esta ha servido también para la diferenciación de la Entamoeba histolytica de otras amibas (15).

Desde entonces dichas reacciones han evolucionado técnicamente principalmente en la obtención de una antígeno cada vez más puro (16, 17). Esto es muy importante para llevar al cabo estudios sobre la especificidad de dichas reacciones.

La investigación sobre la inmunidad inducida por la Entamoeba histolytica ha tenido sus principios en 1931 cuando Michaelis llevó al cabo la inmunización experimental en dos conejos comprobando la producción de anticuerpos antiamibianos con fijación de complemento (18).

Esta clase de experimentos se ha repetido con algunas variantes en el tipo de antígeno empleado hasta llegar al empleo de amibas de cultivos axénicos y las reacciones usadas para la demostración de anticuerpos antiambiánicos (8, 16, 17).

En 1958 Heinz y colaboradores demostraron que los anticuerpos antiambiánicos se encontraban en la fracción gamma de las globulinas (19). En 1966 Maddison los identificó como inmunoglobulina G (IgG) (20).

En los estudios que se han llevado al cabo se ha observado que la duración de la inmunidad inducida por la Entamoeba histolytica es muy variable en cada individuo (19, 21). Sin embargo en forma general ésta puede oscilar de tres meses a varios años (21). La existencia de anticuerpos en el suero no indica que las personas estén inmunes y no presenten la enfermedad amibiasis. Sin embargo, las personas que están en contacto con la Entamoeba histolytica son más resistentes a padecer de amibiasis (21). Para poder hacer conclusiones adecuadas sobre el tipo de inmunidad que induce Entamoeba histolytica es importante tener un mayor conocimiento sobre su morfología, su citología y su antigenicidad.

En numerosos trabajos se describen los aspectos estructurales de los trofozoítos de Entamoeba histolytica tanto con microscopía

óptica (22-23) como con microscopía electrónica (24-27). Otros trabajos se refieren a la identificación de determinantes antigénicos en los trofozoitos por métodos bioquímicos y estudios inmunológicos (5-16). Sin embargo existen muy escasos trabajos que se refieran a la localización estructural de esas determinantes antigénicas (28) y ninguno desde el punto de vista inmunocitoquímico para microscopía electrónica.

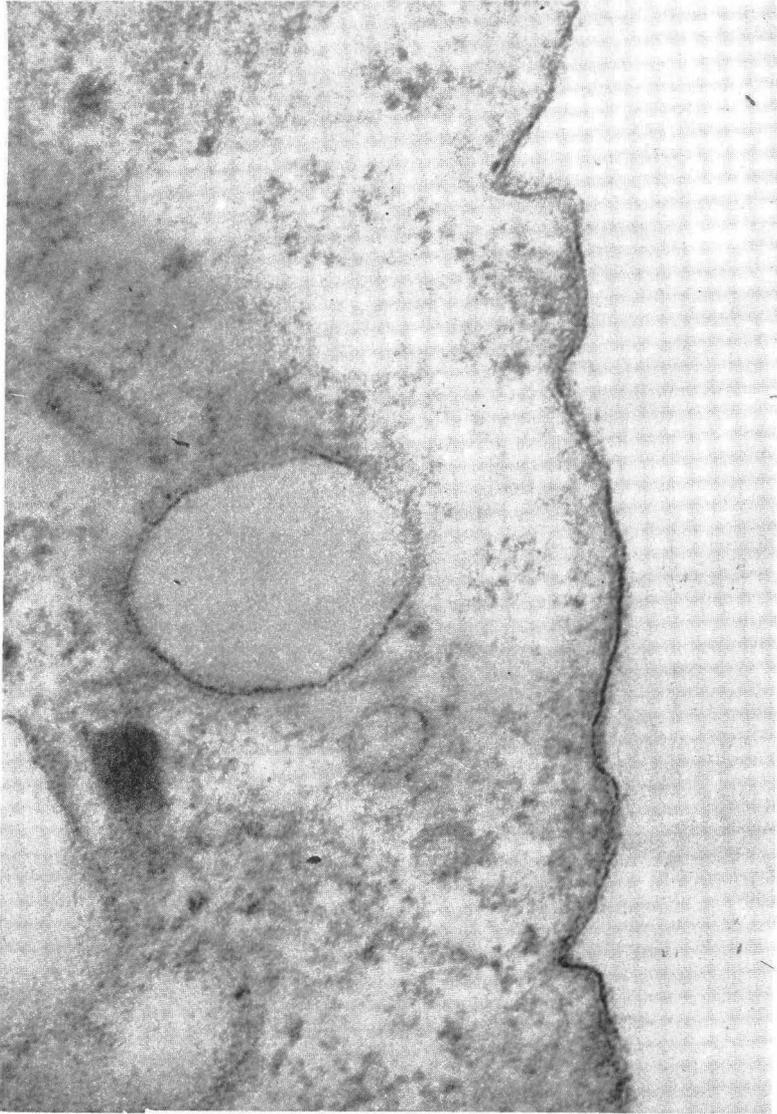


FIG. No. 2.- Micrografía electrónica que muestra parte de un trofozoito de E. histolytica teñido con citrato de plomo y acetato de uranilo para observar con detalle la estructura trilaminar de la membrana plasmática (108,000 x). (Cortesía del Dr. Alfredo Feria Velasco).

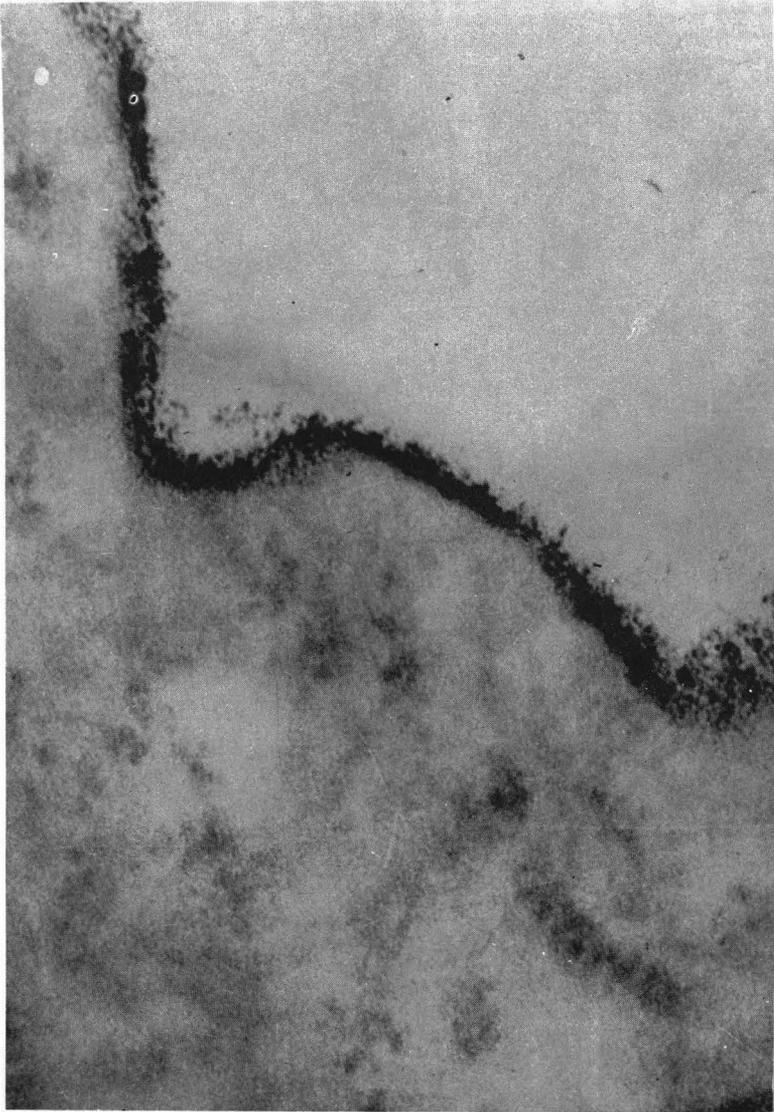


FIG. No. 3.- Aspecto del glucocálix en un trofozoito de E. histolytica cultivado axénicamente y teñido con azul alciano y lantano durante la fijación. Corte sin contrastar (112,000x). (Cortesía del Dr. Alfredo Feria Velasco).

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

Amibas.- En todos los experimentos se emplearon trofozoitos de Entamoeba histolytica cepa HK-9NIH; cultivados en condiciones axéni cas de acuerdo con el método de Diamond (29).

Sueros.- Para obtener los anticuerpos antiamibianos se procedió a separar la inmunoglobulina G (IgG) del suero de pacientes con absceso hepático amibiano y que tuvieron anticuerpos antiamibianos que dieron una reacción francamente positiva de +++ sin diluir empleando el método de contrainmunolectroforesis (CIEF) (11). Como testigos se utilizaron sueros de personas sanas que no tuvieron anticuerpos antiamibianos demostrables por CIEF (11) y que clínicamente no habían padecido amibiasis.

Separación de la IgG con sulfato de amonio (30)

Soluciones:

Solución saturada de sulfato de amonio.

Sulfato de amonio	104 g.
Agua destilada	100 ml.

Solución de hidróxido de sodio 2 N

Hidróxido de sodio	0.8 g.
Agua destilada	10 ml.

Solución salina 0.15 M

Cloruro de sodio	0.8764 g.
Agua destilada	100 ml.

Amortiguador de salina-borato (0.15 M) pH 8.4-8.5

Acido bórico	6.184	g
Borax	9.536	g
Cloruro de sodio	4.38	g
Agua destilada cbp	1000	ml
Solución de ácido clorhídrico	1 N	ml

Material y equipo:

Matraces Erlemeyer de 150 ml
Tubos cónicos de centrifuga de 15 ml
Pipetas de 1 ml graduadas en centésimas
Agitador magnético
Tubos de celofán para diálisis
Recipiente cilíndrico de 6 litros
Centrifuga LKB, GLC-4
Potenciómetro

Procedimiento:

Se centrifugaron 50 ml de suero ya sea con anticuerpos anti**amibia** nos o sin ellos durante 30 minutos a 3000 rpm a 23°C para clarificarlo.

El sobrenadante se pasó a un matraz Erlemeyer y bajo agitación constante del suero, se añadieron gota a gota 25 ml de solución saturada de sulfato de amonio observándose la formación de un precipitado. Se ajustó

el pH de la solución a 7.8 con varias gotas de solución de hidróxido de sodio 2 N. Se continuó la agitación de la suspensión durante 2 horas en la primera precipitación y en las 2 siguientes se agitó sólo 30 minutos. Se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos a 23°C. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se disolvió en suficiente solución salina para restaurar el volumen original de la muestra (50 ml). En la primera precipitación se obtienen las globulinas con restos de albúmina. La purificación de la IgG se obtiene con dos precipitaciones más, las cuales se llevaron al cabo en la misma forma excepto que en la tercera el precipitado se disuelve en 25 ml de amortiguador de solución salina-borato a pH 8.4.

Para eliminar el sulfato de amonio, se dializó contra amortiguador de solución de salina-borato pH 8.4 durante 3 días bajo agitación constante con agitador magnético a 4°C con 2 cambios al día. La diálisis se debe conducir a un pH ligeramente alcalino para evitar la desnaturación de la proteína que tiende a ocurrir a pH menor de 7. Para comprobar que se llevó al cabo la eliminación del sulfato de amonio se hizo una prueba para investigación de sulfatos: A 50 ml de amortiguador de la diálisis se adicionaron 1-2 gotas de HCl 1 N, y unas gotas de solución saturada de BaCl₂

La formación de un precipitado blanco indica la presencia de

sulfato de amonio.

PURIFICACION DE LA IgG POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE CELULOSA

(31, 32).

Soluciones:

Amortiguador de solución salina-fosfatos 0.1 M, pH 7.5

Na_2HPO_4	-	12.0 g.
NaH_2PO_4	-	2.0 g.
H ₂ O dest.	-	1000 ml.

Se mezclaron en proporción de 10% de amortiguador de fosfatos con 90% de solución salina 0.15 M.

DEAE celulosa 45 g peso seco, equivalente a 340-350 g hidratada.

Hidróxido de sodio 0.1 N

Hidróxido de sodio	4.0 g
Agua destilada cbp	1000 ml

Hidróxido de sodio 0.5 M

Hidróxido de sodio	20 g
Agua destilada cbp	1000 ml

Acido clorhídrico 0.1 N

Acido clorhídrico (30%)	7.8 ml
Agua destilada cbp	1000 ml

Cloruro de sodio 0.5 M

Cloruro de sodio	29.25 g
Agua destilada cbp	1000 ml

Material y equipo:

Matraces Erlenmeyer de 1000 ml.

Matraces aforados de 1000 y 2000 ml.

Probetas graduadas de 100 y 500 ml.

Embudo de Büchner de 15 cm de diámetro.

Filtros redondos de manta de 15 cm de diámetro.

Soportes y pinzas para columna de cromatografía

Batidora de aspas

Potenciómetro

Bomba de vacío

Columna de cromatografía 60x2.5 cm (diámetro interno)

Procedimiento:

En un vaso de precipitado de 4 litros se pusieron los 45 g. de la DEAE-celulosa, (Dietilaminoetil celulosa), se le adicionaron 2 litros de cloruro de sodio 0.5 M y se agitó brevemente con un agitador de vidrio. Inmediatamente se adicionaron 2 litros de hidróxido de sodio 0.5 M y se mezcló con la batidora de aspas durante 15 minutos únicamente porque de ser más se alcaliniza demasiado la DEAE-celulosa. Se filtró la sus

pensión en el embudo de Büchner con filtros de manta y el filtrado se eliminó.

La DEAE-celulosa se resuspendió en 4 litros de agua destilada y se mezcló en la batidora durante 15 minutos. Se filtró la suspensión eliminando el filtrado. Este procedimiento se repitió utilizando el amortiguador solución salina-fosfatos 0.1 M a pH 7.5.

La suspensión se dejó 18 horas en el cuarto frío a 4°C.

La columna de vidrio para cromatografía se tapó en el extremo inferior con un tapón de rasca que llevaba en sí mismo una malla metálica fina y un filtro de tela de nylon que ajustaba exactamente con la extremidad inferior de la columna, a fin de retener las partículas de DEAE-celulosa. En el extremo superior de la columna se colocó un tapón de hule perforado que sostenía un embudo que podía contener oculto un volumen de un litro en el cono. Dentro de éste se colocaron las aspas de la agitadora, las cuales se hicieron girar a 100 rpm. Se vació en el embudo una suspensión de DEAE-celulosa que estaba diluida 5 veces con respecto a la mezcla original, el flujo de la suspensión de DEAE-celulosa se ajustó a 60 gotas por minuto, regulando una llave de paso colocada por debajo del tapón de la columna. De esta manera las partículas de DEAE-celulosa fueron cayendo hacia el fondo de la columna y se empacaron en ella de abajo arriba de manera uniforme y continua.

La columna se dejó empacar hasta 10 cm por debajo del orificio superior, dejándose un exceso de solución amortiguadora que rebasara 5 cm la altura de la columna de DEAE-celulosa, manteniéndose en estas condiciones hasta el paso siguiente.

Se lavó después la columna con amortiguador de solución de salina-fosfatos 0.1 M a pH 7.5 durante dos días hasta equilibrarla al mismo pH del amortiguador.

Por otra parte los 30 ml de la solución de IgG obtenida por precipitación con sulfato de amonio se dializaron previamente con el mismo amortiguador durante dos días con dos cambios al día de 6 litros cada uno, para equilibrarla con el líquido de la columna.

Se drenó el sobrenadante de la columna y se adicionaron gota a gota los 30 ml de la solución de IgG por las paredes de la columna y se dejó que se absorbiera en la DEAE-celulosa. Se colocó un recipiente con amortiguador en un lugar elevado 50 cm. con respecto al extremo superior de la columna y se hizo fluir el amortiguador a 60 gotas por minuto para llevar al cabo el corrimiento. El efluente se recolectó en fracciones de 10 ml y se leyeron a 280 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ-II. Las fracciones cuyas lecturas demostraron que contenían proteína en el pico de elución de la IgG se juntaron en tubos de celofán a 4°C durante 12 horas para concentrar la proteína por desecación.

Para recuperar la DEAE-celulosa que se utilizó, ésta se lavó varias veces con volúmenes de 3 litros de agua destilada y 3 a 4 lavados en la siguiente secuencia para cada ciclo: NaOH 0.1 N, otro con agua destilada, el siguiente con HCl 0.1 N y el último lavado debe terminarse con alcali y volverse a hacer varios lavados con 3 litros de agua destilada cada uno. La suspensión se guardó a 4°C hasta volverse a utilizar.

DOBLE DIFUSION POR EL METODO DE OUCHTERLONI (33). Este procedimiento se llevó al cabo con el fin de comprobar si la proteína obtenida era IgG y si contenía anticuerpos antiambiianos.

Se basa en la reacción específica de precipitación que ocurre cuando el antígeno está en presencia de su anticuerpo correspondiente, formando se en la placa de agar una banda de precipitación. El número de bandas de precipitación depende del número de fracciones antigénicas, debido a que cada una se difunde a diferente velocidad. Con esta técnica se evita el fenómeno de zona.

Soluciones:

Amortiguador de barbituratos, pH 8.6, fuerza iónica 0.1

Acido dietilbarbitúrico	2.8 g.
Barbiturato de sodio	20.6 g.
Agua destilada cbp	1000 ml.
<u>Ion agar No. 2</u>	0.85g.
<u>Azida de sodio</u>	0.02g.

Procedimiento:

Se disolvieron 0.85 g de Ión agar en 100 ml de amortiguador de barbituratos y se añadieron 20 mg de azida de sodio. Esto se disolvió en autoclave a 15 lb de presión durante 15 minutos. Se vertieron 15 ml de la mezcla aún caliente en una caja de Petri sobre una mesa nivelada y se dejó solidificar.

Cuando el agar estaba solidificado, se hicieron 6 perforaciones de 3 mm. de diámetro en círculo y una más central, distantes 4 mm. entre sí y se extrajo el agar con succión. En ellos se colocaron las muestras con un capilar, procurando depositar la misma cantidad de material en cada orificio. En el orificio central se colocó antígeno amibia no soluble y en los orificios periféricos se colocaron las soluciones de IgG humana anti E. histolytica y de IgG humana de personas sin amibiasis, así como el suero de conejo con anticuerpos anti IgG humana (Fig. 4). A continuación las placas se incubaron durante 48 horas a 22°C.

Una vez que se presentaron las bandas de precipitación, se lavaron las placas con solución salina-0.15 M para quitar las proteínas excedentes no precipitadas y observar mejor la reacción.

INMUNOELECTROFORESIS (34).

Este proceso se basa en la combinación de la técnica de electroforésis, la cual consiste en una separación de las proteínas por su movilidad electroforética en base de su carga eléctrica y una vez que las proteínas se han separado electroforéticamente, se ponen en contacto con su

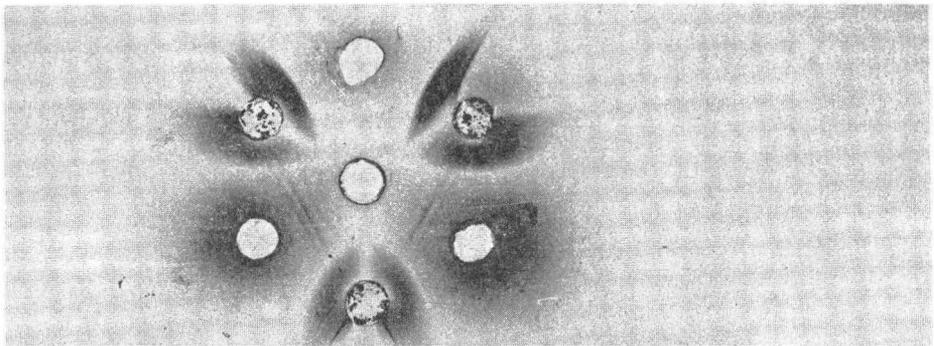
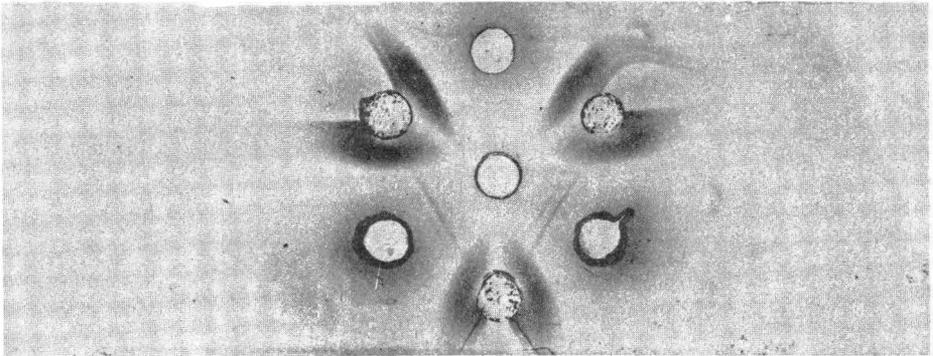


FIG. 4.- Placas de doble difusión por Método Ouchterlony.

Orificio central antígeno amibiano, orificios periféricos soluciones de IgG humana antiamiba, IgG humana normal y suero de conejo anti IgG humana.

antisuero correspondiente para llevar al cabo la inmunodifusión; así aparecen las bandas de precipitación correspondientes a las proteínas presentes. Esto se hizo con el propósito de comprobar si la proteína obtenida era IgG, en forma pura y si contenía anticuerpos antiambianos.

Soluciones:

Amortiguador de barbituratos, pH 8.6, fuerza iónica 0.1

Acido barbitúrico	2.8 g.
Barbiturato de sodio	20.6 g.
Agua destilada	1000 ml.

Solución de agar:

Agar noble	1 g.
Amortiguador de barbituratos pH 8.5	25 ml.
Agua destilada	75 ml.
Azida de sodio	0.02 g.

Solución salina 0.15 M

Cloruro de sodio	8.764g.
Agua destilada	1000 ml.

Colorantes:

Negro de amido	3 g.
Solución alcohol-acético	500 ml.

Solución alcohol-acético (solución lavadora):

Alcohol metílico 1350 ml.

Agua destilada 1350 ml.

Acido acético glacial 300 ml.

Suero de conejo antisuero humano

Suero de conejo anti IgG humana

Suero de Conejo anti IgD humana

Fracciones de proteína obtenida en la columna de DEAE-celulosa.

Procedimiento:

Se colocaron los portaobjetos de 2.5 cm. en el soporte de plástico después de un ligero enjuague con alcohol.

Se niveló la mesa sobre la que estaban las laminillas y con una pipeta de 10 ml. se tomaron aproximadamente 12 ml. del medio de agar caliente y se empezó a verter el agar en los extremos que no lograron cubrir los portaobjetos, donde se unen éstos y se continuó agregando el agar en forma homogénea hasta cubrirlos totalmente. Se dejaron reposar 20 horas a 4°C.

En las placas de gel-agar se hicieron dos orificios colocados en el centro, transversalmente al portaobjetos y separados entre sí 10 mm. y un surco central en sentido longitudinal de 2 mm. de anchura que pasara entre los orificios. Se retiró el gel de los orificios y se colocaron las fracciones obtenidas en cromatografía en columna para probar su pureza, así como los testigos. Los primeros correspondieron a IgG humana anti E. his-tolytica y los segundos a IgG humana de personas sanas sin antecedentes

clínicos de amibiasis.

Las placas de electroforesis quedaron colocadas en series de 3 laminillas de portaobjetos alineados a lo largo de su eje mayor en marcos de plástico, que son accesorios del mismo aparato. Así se colocaron en la cámara de migración electroforética, la cual contenía 700 ml de la solución amortiguadora en cada cubeta. Cada hilera de 3 placas se conectó por medio de una tira de papel filtro del mismo ancho que la placa, humedecida en el mismo amortiguador.

A través de las placas se hizo pasar una corriente directa de 6V/cm. y 0.76 mA durante 60 minutos, al término de los cuales se retiró el gel del surco central. En este surco se colocó ya sea un suero de conejo anti suero humano (Fig. 5A), un suero de conejo Anti IgG humana (Fig. 5B), ó antígeno amibiano soluble (Fig. 5C). El antisuero se dejó difundir en las placas de agar y éstos se incubaron en cámara durante 20 horas a temperatura ambiente, al cabo de los cuales se sumergieron en la solución salina 0.15 M, 24 horas para solubilizar de ellas proteínas no precipitadas. En seguida se cubrieron con tiras de papel filtro y se dejaron secar sobre la mesa. Se retiró el papel y se tñieron con la solución de negro de amido durante 5 minutos y el exceso de colorante se retiró por inmersión durante 10 minutos en varios

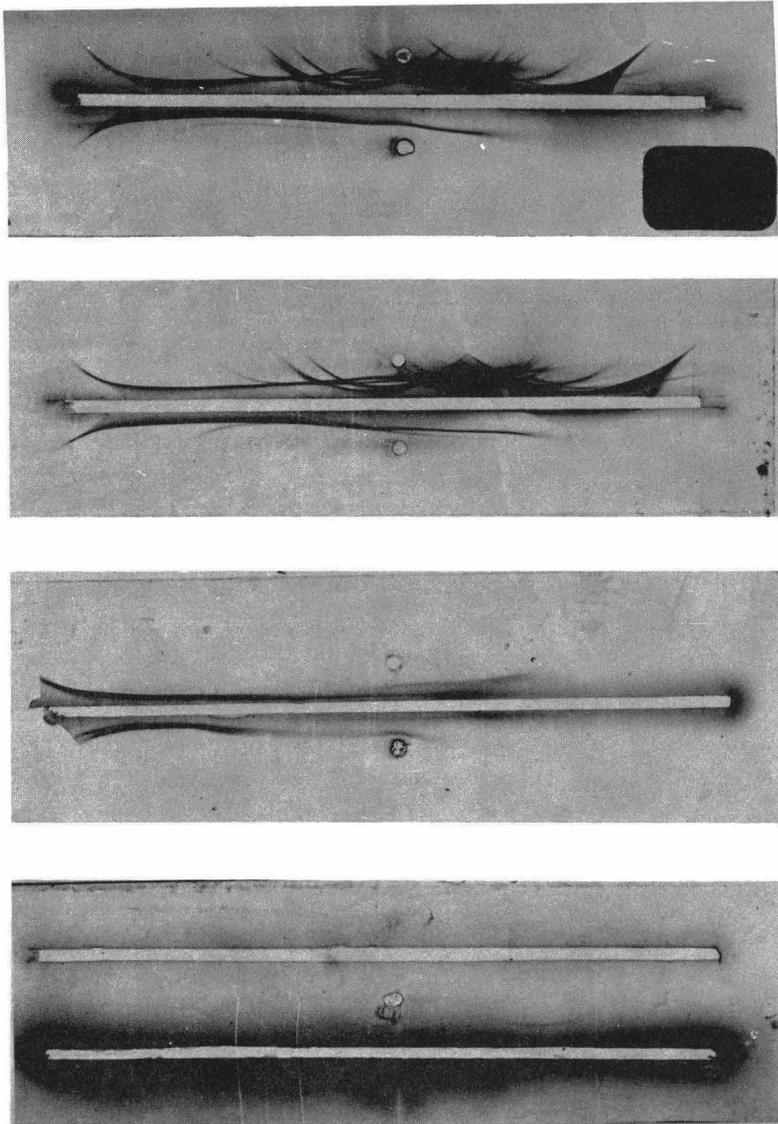


FIG. No. 5.- Placas de inmunolectroforesis.

- a) Orificios: suero completo humano, IgG anti~~am~~ibica o IgG normal. Surco central suero de conejo anti suero humano polivalente.
- b) Orificios: fracciones de IgG anti~~am~~ibica y IgG normal. Surco central suero de conejo anti IgG humana
- c) Orificios: Fracciones de IgG anti~~am~~ibica y IgG normal. Surco central antígeno amibiano soluble.

cambios de solución lavadora y se secaron a temperatura ambiente para interpretación de los resultados (Fig. 5).

CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY (35).

La cuantificación de la proteína se hizo por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu en el cual se mide el color azul que produce al añadir el reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu a una solución alcalina de proteína. La intensidad del color depende del contenido de tirosina y triptofano. Es esencial la calibración de una curva con relación lineal entre las diferentes diluciones de proteína de concentración conocida y la densidad óptica. La muestra de concentración desconocida debe ser diluida hasta que la primera determinación resulte con una densidad óptica dentro de la curva de calibración. El método de Lowry y colaboradores utiliza una solución alcalina de cobre en el tratamiento de la proteína, el cual reduce al reactivo fosfomolibdico-fosfotungstico aumentando de 3 a 15 veces el color de la reacción y teniendo un rango de sensibilidad de 0.005-0.2 mg. de proteína por mililitro.

Soluciones:

A-1:

Tartrato de sodio 2.0 g.

Agua destilada 100.0 ml.

A-2:

Sulfato de cobre 5 H₂O 1.0 g.

Agua destilada 100.0 ml.

A-3:

Carbonato de sodio 20.0 g.

Solución de NaOH 0.1 N 1000.0 ml.

Proporciones:

A-1 0.5 ml.

A-2 0.5 ml.

A-3 50.0 ml.

Se mezclan inmediatamente antes de utilizarse.

Solución B

Reactivo de Folin-Ciocalteu = 1.0 N. Diluir el reactivo de fenol 1:1 con agua destilada.

Solución de albumina a concentración de 220 mg., solución standard.

Fracciones de la solución de IgG obtenidas en la columna de DEAE-celulosa.

Solución salina 0.15 M, 10 ml.

Material y equipo:

Tubos de ensaye de 15x150 mm.

Pipetas de 0.2, 1.0 y 5.0 ml.

Colorímetro spectronic 20 Bausch & Lomb.

Procedimiento:

Se colocaron alícuotas de 1.00, 0.500, 0.250 y 0.125 ml. de la solución de albumina en tubos de ensaye y se llevaron a 1 ml. con solución salina 0.15 M quedando en las siguientes concentraciones: 220 mg/ml, 110 mg/ml, 55 mg/ml y 27 mg/ml. Las lecturas que se obtuvieron de estos tubos son los que se utilizaron para hacer la curva de calibración.

En otros tubos se colocaron las siguientes alícuotas de solu-

ción de IgG obtenida en la columna de DEAE-celulosa: 0.1 ml de solución original y diluciones 1:2, 1:4 y 1:8 de esta solución. Todos los tubos se llevaron a 1 ml con solución salina 0.15 M.

Se añadieron 4 ml de la solución A a cada uno de los tubos, se mezclaron y se dejaron reposar 10 minutos a 23°C.

Transcurrido este tiempo se adicionaron 0.4 ml de la solución B de fenol a cada tubo, se mezcló cada tubo vigorosamente inmediatamente después de la adición y se dejaron reposar 30 minutos durante los cuales se desarrolló el color, debiéndose leer antes de 60 minutos.

Se hizo un tubo para blanco que contenía 1 ml de solución salina 0.15 M, 4 ml de la solución A y 0.4 ml de la solución B.

Todos los tubos se leyeron en un colorímetro Spectronic 20 Baush & Lomb a 600 nm; se restó la lectura del blanco a las lecturas de la curva de calibración (D.O./Conc.) de proteína y se leyeron los datos de las muestras. Se obtuvo una concentración de 220 mg/ml de IgG con anticuerpos antiambianos y de 200 mg/ml de IgG sin ellos.

Las fracciones de IgG se liofilizaron para concentrarlas.

INMUNOFLUORESCENCIA (36,37)

Este método se utilizó para demostrar los antígenos de superficie de la Entamoeba histolytica y se llevó al cabo tanto en la reacción directa como en la indirecta.

Soluciones:

Amortiguador de fosfato de sodio 0.1M, pH 7.5

Na_2HPO_4	12.0 g
NaH_2PO_4	2.0
Agua destilada	1000 ml

Amortiguador de carbonato-bicarbonato 0.5 M, pH 9.5

Carbonato de sodio	5.3 g
Bicarbonato de sodio	4.2 g
Solución salina 0.15 M	200 ml

Se disolvieron 5.3 g de carbonato de sodio en 100 ml de NaCl 0.15 M (solución A) y 4.2 g de bicarbonato de sodio en otros 100 ml de NaCl 0.15 M (solución B). Se mezclaron 5.8 ml de la solución A con 10 ml de la solución B y se ajustó el pH a 9.5 con más solución A ó B.

Isotiocianato de fluoresceína (ITF) 0.05 mg por cada mg de proteína por marcar.

Sephadex G 200 18.0 g peso seco.

Amortiguador de solución salina-fosfatos 0.15 M, pH 7.5

Na_2HPO_4	18 g
NaH_2PO_4	3.0 g
Agua destilada cbp.	1000 ml

Se mezclaron en proporción de 10% de amortiguador de fosfatos con 99% de solución salina 0.15 M.

Materia y equipo:

Columna de cromatografía 30x15 cm (diámetro interno).

Soportes y pinzas para columna de cromatografía.

Probetas de 100 ml

Tubos de ensaye

Pipetas Pasteur

Pipetas de 5 ml

Tubos de celofán para diálisis

Recipiente cilíndrico de 6 lts.

Potenciómetro

Espectrofotómetro PM Q II de Zeiss.

Procedimiento de conjugación:

La conjugación debe hacerse en una proporción de 5 a 10 moles de ITF con / mol de IgG. Por cada mg de IgG se adicionaron 0.05 mg de ITF o sea una relación de ITF/IgG de 20.5/1 teniendo en

cuenta que no se conjuga todo el ITF hay además cierta pérdida durante la diálisis.

La concentración de proteína que se debe utilizar para una conjugación óptima es de 10 a 30 mg/ml. Teniendo en cuenta lo anterior se disolvieron 285.6 mg. de IgG liofilizada en 10 ml de solución salina, 0.15 M. A esto se adicionaron 2 ml de amortiguador de carbonato-bicarbonato, pH 9.5 y se mezclaron lentamente en un agitador magnético. A esta mezcla se añadieron 14.28 mg de ITF disueltos en 2 ml del mismo amortiguador. Se ajustó el pH a 9.5, se protegió de la luz y se agitó lentamente durante 18 horas a 4°C.

La mezcla se recogió en un tubo de celofán para diálisis y con el objeto de eliminar el ITF no conjugado se dializó con 48 litros de amortiguador de solución salina-fosfatos, 0.15 M a pH 7.5 con agitación constante durante 2 días, efectuándose dos cambios de 6 litros cada hora y el resto cada doce horas.

Para tener una mayor purificación del conjugado, éste se pasó por una columna de 30x1.5 cm. de diámetro interno cargada con 18 g de Sephadex G-200 hidratado con 70 ml de amortiguador de solución salina-fosfatos 0.15 M a pH 7.5. El pH del amortiguador no debe exceder de 8 durante la preparación de la suspensión ni durante la cromatografía, a fin de evitar cambios en los grupos amino de los anticuerpos.

Una vez empacada la columna, se depositaron lentamente los 16 ml del conjugado. Se dejaron absorber en ella y luego se agregaron lentamente 6 ml de amortiguador.

Para que el conjugado descendiera se dejaron absorber y en este paso se observó el inicio de la separación del conjugado del ITF soluble formándose una banda inferior nítida naranja fluorescente y otra banda superior difusa amarillo-naranja. Esta estaba formada por el ITF no conjugado. Se hicieron 10 lavados de la columna de 100 ml cada uno con amortiguador de solución salina-fosfatos pH 7.5. para recuperar el Sephadex

Este procedimiento se hizo en un cuarto semioscuro, a 4°C para evitar la pérdida de fluorescencia.

Las fracciones se recolectaron manualmente en tubos de ensaye. Los primeros 6 ml de la solución se colectaron en una sola fracción porque contenía la mayor parte del conjugado. Las otras fracciones fueron de 1 ml cada una. Estas se juntaron desde que se observó la salida de la primera banda naranja de la columna. Las siguientes fracciones se colectaron en matraces de 100 ml. Las fracciones del conjugado se leyeron en un espectrofotómetro P M Q II de Zeiss a 276 y a 493 nm, que son las longitudes de onda donde hay mayor absorción del conjugado, de la IgG y del ITF, respectivamente.

Para poderse leer en el espectrofotómetro hubo que diluir el conjugado de 1:30. Las lecturas obtenidas fueron a 273 nm :0617, y a 493 nm: 0.765.

Se leyó en el monograma la relación de mcG de ITF a mg de IgG obteniéndose una relación de 17.5 mcg/mg y una relación molar de ITF/IgG de 7.5 la cual queda en los límites aceptables que son de 5 a 10.

La relación entre los mg de proteína con los ml del conjugado fué de 0.275 mg/ml en la dilución y de 7.2 mg/ml en el conjugado no diluido.

El conjugado se guardó en alícuotas de 3 ml en el congelador a -20°C.

La conjugación de la IgG de personas sin anticuerpos antiamibianos demostrables por CIEF, se llevó al cabo en la misma forma obteniéndose las lecturas siguientes: a 273 nm:0198 y a 493 nm: 0.43. En el monograma la relación ITF/IgG fué de 15.5 mg prot/ml con una relación molar ITF : IgG de 6.5

Reacción directa.- Los trofozoítos de E. histolytica se lavaron con solución salina 0.15 M 3 veces y se agregó la solución del conjugado de la IgG humana antiamibiana marcada con ITF a diluciones de 0.25, 0.5,

1.0, 2.0 y 4.0 mg/ml.

Esta suspensión se agitó durante 30 minutos a 0-2°C para bajar el metabolismo de la amiba y que no fuera a digerir el conjugado y se tuvieran resultados falsos positivos. Se lavaron 3 veces con 5 ml. en cada lavado con amortiguador de solución salina-fosfatos 0.15 M pH 7.5. Este mismo procedimiento se llevó al cabo con IgG conjugada con ITF de personas sin anticuerpos antiambianos que se usaron como testigos.

Las preparaciones se observaron en microscopio de luz transmitida equipado con lámpara de luz ultravioleta.

Reacción indirecta.- Consiste en incubar los trofozoitos fijados previamente con formaldehído al 4% en metanol durante 20 minutos con IgG humana antiambiana no marcada con Isiotiocianato de Fluoreceína durante 30 minutos, a 37°C. Se lavó la suspensión con solución de NaCl 0.15 M y se incubaron con suero de conejo antigamma globulina humana conjugada con Isiotiocianato de fluoreceína en diluciones de 0.25 ml, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 ml. del conjugado. Se lavaron y los trofozoitos se suspendieron sobre un portaobjetos con solución de glicerina al 90% en amortiguador de fosfatos-salina 0.15 M pH 7.5 y se observaron al microscopio de luz ultravioleta.

El mismo procedimiento se realizó con la IgG de personas sin anticuerpos antiambiobianos que se utilizaron como testigos.

Fijación de C'3 sobre trofozoítos de Entamoeba histolytica.

Se lavaron 4 veces los trofozoítos con solución de NaCl 0.15 M, se fijaron con formaldehído al 4% en metanol durante 20 minutos, se lavaron con solución de NaCl 0.15 M y se incubaron a 37°C con 1 ml de IgG humana antiambiobiana sin marcar en concentración de 5 mg de proteína en 10 ml de solución de NaCl 0.15 M. Se lavaron 3 veces para eliminar el exceso de proteína y se incubaron con suero humano fresco. Después de lavarlos se incubaron con suero de cabra anti C'3 conjugado con Isiotiocianato de Fluoreceína, los trofozoítos se lavaron y después de eliminar el sobrenadante, se colocaron sobre un portaobjetos y se examinaron en un microscopio.

Como testigo de esta reacción se realizaron las mismas incubaciones, utilizando la misma IgG humana antiambiobiana no marcada, con la única diferencia que en lugar de emplear suero humano completo fresco, se utilizó suero humano inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos.

CONJUGACION DE IgG CON PEROXIDASA DE RAIZ FUERTE (HRP). (38)

Soluciones:

Amortiguador de Carbonato-bicarbonato de sodio pH 10, 0.5 M.

Carbonato de sodio 2 M

Carbonato de sodio anhidro	19.0 g
Agua destilada cbp	100.0 ml

Bicarbonato de sodio 2 M

Bicarbonato de sodio	19.2 g
Agua destilada cbp	100.0 ml

Para preparar el amortiguador de carbonato-bicarbonato 0.5 M pH 10 se mezclan 13.8 ml de carbonato de sodio 2M y se añaden 11.3 ml de bicarbonato de sodio 2M. Esto se afora a 100 ml con agua destilada y se ajusta el pH a 10, con la primera o segunda solución.

Amortiguador Tris.HCl 0.05 M, pH 7.6:

Solución Tris 0.2 M:

Tris-(hidroxi-amino-metano-metil (THAM)	2.42 g.
--	---------

Agua destilada cbp	100.0 ml
--------------------	----------

Para preparar el amortiguador se mezclan 50 ml de la solución Tris 0.2 M con 70 ml de HCl 0.1N. Se mide el pH y se ajusta a 7.6 con estas soluciones y se completa el volumen a 200 ml con agua destilada.

Peroxidasa Raiz Fuerte 50 mg

FNPS (pp'-difluoro, mm'-dinitrofenil sulfona) al 5% en acetona,
0.25 ml.

Solución salina 0.15 M

IgG por conjugar	50 mg
------------------	-------

Solución de sulfato de amonio al 50% de saturación.

Procedimiento:

La preparación del conjugado de la IgG con peroxidasa se hizo di solviendo 50 mg de IgG en 1 ml de amortiguador de carbonato-bicarbonato 0.5 M, pH 10. A ésto se añadió 0.25 ml de FNPS (pp'-difluoro, mm'-dinitrofenilsulfona) al 5% en acetona.

La mezcla se agitó de 18 a 20 rpm en un disco rotatorio durante 6 horas a 4°C y se dializó 18 horas con amortiguador de salina-fosfatos a pH 7.5. La solución del conjugado de IgG con peroxidasa se precipitó 2 veces con sulfato de amonio al 50% de saturación. Se dializó en solución salina 0.15 M durante dos días con 3 cambios de 6 litros cada uno, para quitar el exceso de sulfato de amonio.

El dialisado se guardó a -20°C en alícuotas de 1 ml cada una, en tubos de ensaye protegidos de la luz. Este mismo procedimiento se llevó al cabo ya sea con la IgG anti*mibiana*, con la IgG sin anticuerpos anti*miba* (demostrables por CIEF), así como con el suero de conejo anti IgG humana.

Reacción directa.-

Los trofozoítos de Entamoeba histolytica se lavaron con 0.15 M con solución salina y se fijaron en formaldehído al 4% en metanol durante 20 minutos a 23°C. Después de lavarlos con amortiguador Tris-HCl, 0.05 M, pH 7.6, se incubaron con la solución de IgG humana marcada con peroxida-

de pacientes con absceso hepático y con anticuerpos antiambianos, sa/ durante 30 minutos a 37°C y después de lavarlos en el mismo amortiguador se incubaron en el medio citoquímico de Karnovsky para peroxidasa.

Este consistió en 5 mg de 3,3' diaminobenzidina disueltos en 10 ml de amortiguador Tris-HCl, pH 7.6, 0.05 M y con peróxido de hidrógeno en concentración final de 0.01%. Esta incubación se hizo en la oscuridad durante 10 minutos a 23°C. A continuación los trofozoitos se lavaron en el mismo amortiguador Tris-HCl y se colocaron en portaobjetos para ser observados en un fotomicroscopio.

Para todos los lavados, las suspensiones de trofozoitos se centrifugaron 3 veces a 3000 rpm durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante.

Como testigos se hicieron experimentos utilizando la misma IgG antiambiana y el mismo procedimiento de incubación con el medio citoquímico, con la única diferencia de que éste carecía de sustrato (peróxido de hidrógeno). Además, otra serie de experimentos se realizó incubando los trofozoitos fijados con IgG de personas sin anticuerpos antiambianos demostrados por CIEF y conjugada con peroxidasa. La reac

ción citoquímica se hizo con el medio de Karnovsky completo.

Reacción indirecta.- Esta consistió en incubar los trofozoitos fijados en formaldehído al 4% en metanol con IgG humana anti E.histolytica no marcada con peroxidasa, durante 30 minutos a 37°C. Después de lavado en solución salina fisiológica se incubaron con suero de conejo anti IgG humana marcada con HRP durante 30 minutos a 37°C y se lavaron con amortiguador Tris HCl, 0.05 M, pH 7.6. A continuación se realizó la reacción citoquímica con el medio de incubación de Karnovsky completo, en la oscuridad durante 10 minutos a 23°C.

Después de lavados, los trofozoitos se observaron en un microscopio de luz transmitida.

Como testigos se realizaron 4 series de experimentos:

a) Los trofozoitos fijados se incubaron con IgG humana anti Entamoeba histolytica no marcada y posteriormente incubados con suero de conejo anti IgG humana marcada con peroxidasa, se colocaron en el medio citoquímico de Karnovsky sin sustrato (peróxido de hidrógeno). Después de lavar los trofozoitos se examinaron en un microscopio óptico.

b) Los trofozoitos fijados se incubaron primeramente con IgG humana anti Entamoeba histolytica sin marcar, se lavaron y se incubaron.

con IgG humana anti Entamoeba histolytica marcada con peroxidasa. A con tinuación se lavaron, se hizo la reacción citoquímica con el medio de Karnovsky completo y después de lavarlos se examinaron en un microscopio de luz transmitida.

c) Los trofozoitos fijados con formaldehído al 4% en metanol se incubaron con IgG de personas sin anticuerpos anti amiba demostrables por CIEF y sin datos clínicos ni de laboratorio de amibiasis. Después de la varlos se incubaron con suero de conejo anti IgG humana marcada con HRP, se lavaron y se hizo la reacción citoquímica para peroxidasa. Se lavaron y se observaron en el microscopio óptico.

d) Los trofozoitos fijados, se incubaron solamente en presencia de suero de conejo anti IgG humana marcada con peroxidasa, se lavaron y se llevó al cabo la reacción citoquímica para peroxidasa, de acuerdo con el método de Karnovsky. Después de lavar los trofozoitos se examinaron en un microscopio óptico.

Todos los experimentos de incubación de los trofozoitos con las inmunoglobulinas conjugadas con peroxidasa para las reacciones directas e indirectas se realizaron también con trofozoitos de E. histolytica fija-

dos con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos, 0.1M, pH

7.4.

Investigación de actividad endógena de peroxidasa en los trofozoitos de Entamoeba histolytica.

Para ésto se llevaron al cabo dos tipos de experimentos:

a) Los trofozoitos de Entamoeba histolytica cultivados axénicamente se lavaron en solución salina fisiológica y sin fijar se incubaron en el medio citoquímico de Karnovsky completo, durante 10, 20 y 40 minutos a 23°C en la oscuridad. Se lavaron y se observaron en el microscopio óptico.

b) Los trofozoitos se fijaron en formaldehído al 4% en metanol durante 20 minutos, a temperatura ambiente y después de lavarlos se incubaron en el medio citoquímico de Karnovsky completo, durante 10, 20 y 40 minutos a 23°C en la oscuridad. Se lavaron y se observaron en un microscopio de luz transmitida.

MICROSCOPIA ELECTRONICA.- Se utilizaron tubos representativos de a) la reacción indirecta positiva con IgG humana anti Entamoeba histolytica;
b) la reacción indirecta negativa con la misma IgG antiamebiana pero

incubándolos en medio citoquímico de Karnovsky sin sustrato (H_2O_2); y c) la reacción indirecta negativa con saturación de sitios antigénicos en los trofozoitos con anticuerpos específicos no marcados.

En todos los casos, después de completar el tiempo de incubación con el medio citoquímico de Karnovsky, se lavaron los trofozoitos con amortiguador Tris-HCl, 0.05 M, pH 7.6 y se postfijaron con tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio, 0.1M, pH 7.4 durante 1 hora a 4°C (39).

El amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M pH 7.4 se preparó disolviendo 4.28 gr. de cacodilato de sodio y 5.5 a 6 ml. de HCl, 0.1N en agua destilada para completar un volumen final de 200 ml. El pH se ajustó con esas soluciones antes de completar el volumen con agua destilada.

Las muestras se deshidrataron en concentraciones ascendentes de etanol (70%, 80%, 90%, 96% y alcohol absoluto) y se infiltraron con mezclas de óxido de propileno-Epon. Se incluyeron en Epon-812 y se polimerizaron durante 24 horas a 60°C (40). Se obtuvieron cortes finos color plateado en el espectro de reflexión de luz incidente (41) con navajas de vi

drio en ultramicrotomo Reicher OmU-2 y se recogieron en rejillas de cobre sin cubrir. Los cortes sin teñir o ligeramente contrastados con citrato de plomo (42) fueron examinados en un microscopio electrónico Philips EM-220, operado con 60 KV y equipado con una apertura de la lente objetivo de 30 micras. Los negativos tomados fueron amplificados fotográficamente para su estudio e interpretación.

CAPITULO III

RESULTADOS:

Inmunofluorescencia.- Los resultados de las reacciones de los trofozoitos con inmunoglobulina conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (ITF) aparecen en la Tabla I.

En las pruebas que se hicieron con los trofozoitos de Entamoeba histolytica y la IgG marcada con ITF de personas sanas sin anticuerpos antiambianos demostrables por CIEF no presentaron fluorescencia.

Aquellas pruebas que se realizaron con los trofozoitos y la IgG marcada con ITF de pacientes con absceso hepático y con reacción positiva de +++ de anticuerpos antiambianos por CIEF, la reacción fué positiva (Fig. 6).

Cuando se llevó al cabo la incubación de los trofozoitos con la IgG no marcada de personas sanas sin anticuerpos antiambianos demostrables por CIEF y el suero de conejo anti IgG humana marcado con ITF no se observó fluorescencia en los trofozoitos de Entamoeba histolytica. Sin embargo, se observó ligera fluorescencia en preparaciones obtenidas de algunos sueros de personas sanas sin antecedentes clínicos de amibiasis.

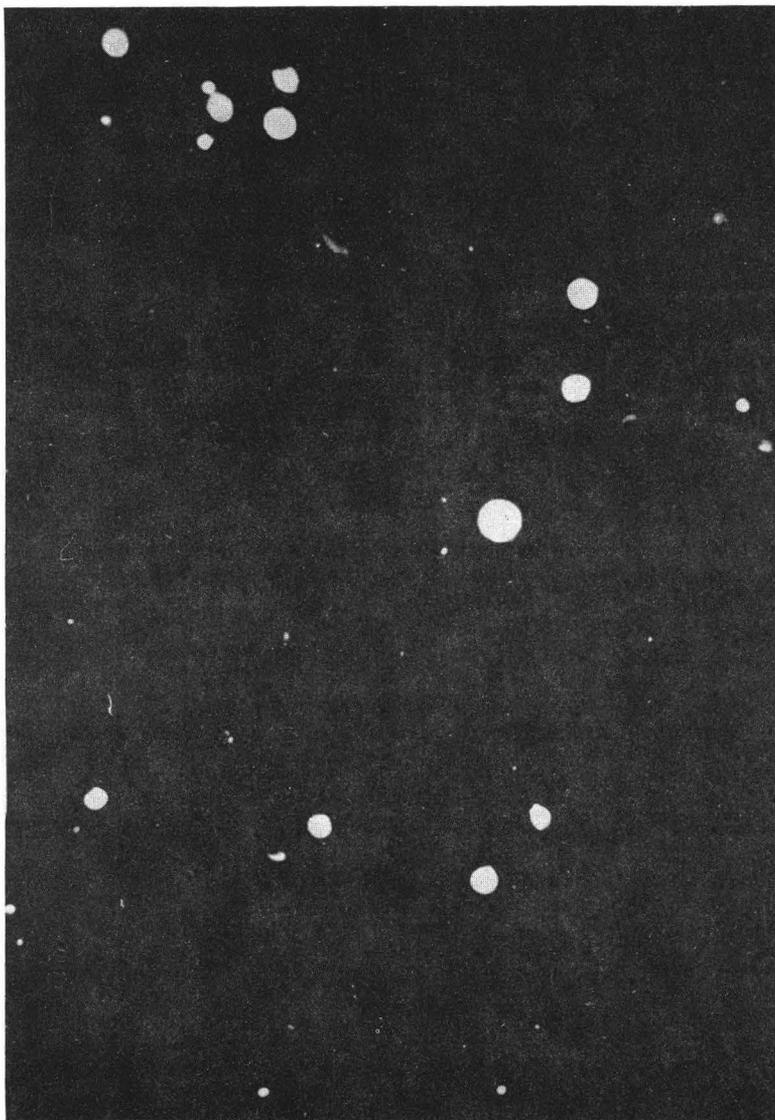


FIG. No. 6.- Resultado positivo de la reacción directa al incubar trofozoitos de E. histolytica con IgG humana anti*ami*biana conjugada con isotiocianato de fluoresceina (80x).

TABLA I

CONJUGACION DE INMUNOGLOBULINAS CON ISOTIOCIANATO
DE FLUORESCINA (*).

Ag+IgG*	—————→	-
Ag+IgGs*	—————→	+
Ag+IgG+AntiIgG hum*	—————→	-
Ag+IgGs+AntiIgG hum*	—————→	+

Ag = Trofozoitos de E. histolytica íntegros, cultivados axénicamente.

IgG = IgG humana de persona "no sensibilizada".

IgGs = IgG humana anti E. histolytica.

AntiIgG hum = IgG de conejo antiIgG humana.

En las pruebas realizadas con los trofozoitos y la IgG no marcada de pacientes con absceso hepático amibiano, con anticuerpos antiamibianos e incubados con sueros de conejo anti IgG humana marcado con ITF la fluorescencia fué francamente positiva (Fig. 7).

Fijación de complemento por Inmunofluorescencia.- Los resultados de estas pruebas aparecen resumidos en la Tabla II.

Se observó fluorescencia positiva cuando en el sistema de incubación se empleó suero humano fresco completo como fuente de complemento (Fig. 8), en tanto que los resultados fueron negativos cuando al sistema de incubación se agregó el suero humano fresco inactivado a 56°C durante 30 minutos.

Reacciones con peroxidasa.- En la Tabla III aparecen los resultados de las incubaciones de los trofozoitos con las inmunoglobulinas marcadas con peroxidasa de raiz fuerte. Cuando los trofozoitos fueron fijados en glu-

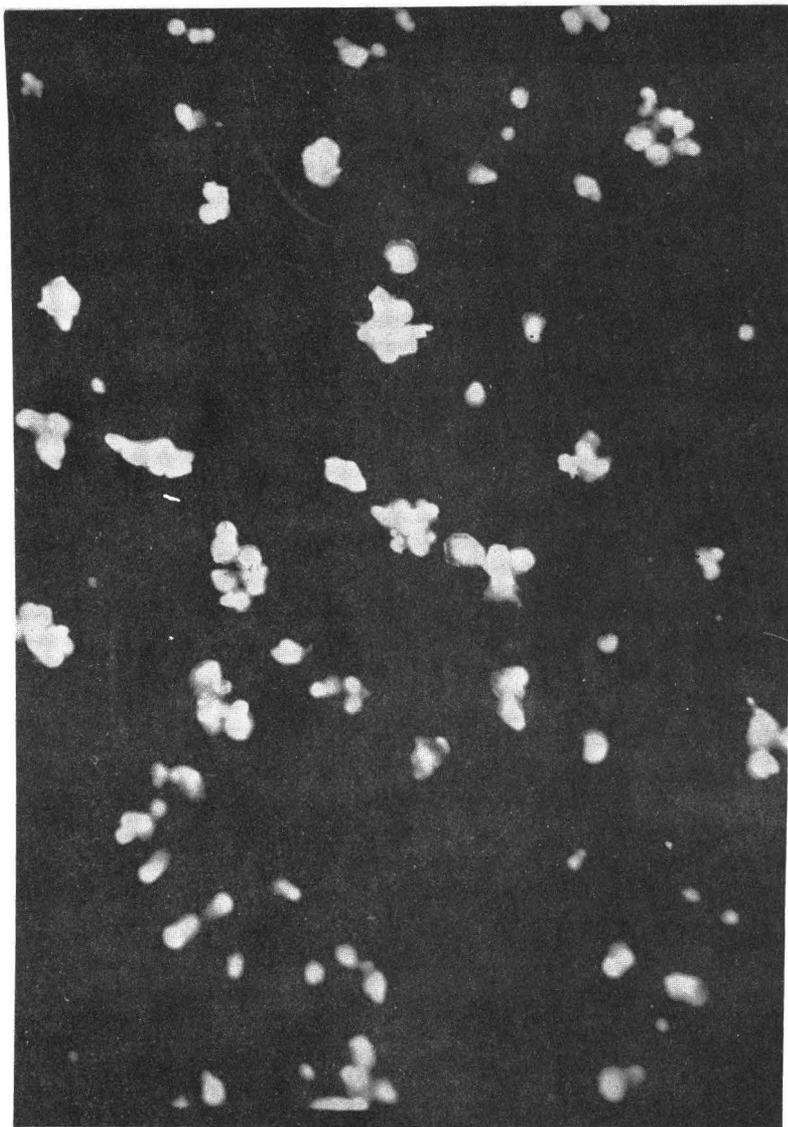


FIG. No. 7.- Resultado positivo de la reacción indirecta al incubar trofozoitos de E. histolytica con IgG humana antiambi- biana sin marcar y posteriormente incubada con anticuer- pos de conejo anti-IgG humana conjugados con isotiocia- nato de fluoresceína (60x).

TABLA II

REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO.

Ag+IgGs+ Suero humano fresco + Anti C'₃*
completo → +

Ag+IgGs+Suero humano fresco
inactivado (56°C,30') + Anti C'₃* → -

Ag = Trofozoitos de E. histolytica inte
gros, cultivados axénicamente.

IgGs+ IgG humana anti E. histolytica.

Anti C'₃* = IgG de cabra anti C'₃ humano,
conjugada con Isotiocianato de
fluoresceina.



FIG. No. 8.- Resultado positivo de la reacción al incubar los trofozoitos de E. histolytica con IgG humana anti*amibiana* en presencia de suero humano completo fresco y anticuerpos de cabra anti-C'3 conjugados con isotiocianato de fluoresceína (90x).

TABLA III

CONJUGACION DE INMUNOGLOBULINAS CON PEROXIDASA DE RAIZ FUERTE (*) Y EFECTO DE LA FIJACION SOBRE LA REACCION.

	Ag en formaldehido al 4% en metanol.	Ag en glutaraldehido al 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.4
Ag + IgG* $\xrightarrow{\quad R \quad}$	-	-
Ag + IgGs* $\xrightarrow{\quad R \quad}$	+	-
Ag + IgGs* $\xrightarrow{\quad R-H_2O_2 \quad}$	-	-
Ag + IgG+AntiIgG hum* $\xrightarrow{\quad R \quad}$	-	-
Ag + IgGs+AntiIgG hum* $\xrightarrow{\quad R \quad}$	+	-
Ag + IgGs+AntiIgG hum* $\xrightarrow{\quad R-H_2O_2 \quad}$	-	-
Ag + IgGs + IgGs* $\xrightarrow{\quad R \quad}$	-	-
Ag + Anti IgG hum* $\xrightarrow{\quad R \quad}$	-	-

Ag = Trofozoitos de E. histolytica íntegros, cultivados axénicamente.

IgG = IgG humana de persona "no sensibilizada".

IgGs = IgG humana anti E. histolytica.

AntiIgG hum.= IgG de conejo o de cabra anti IgG humana.

taraldehido todos los resultados fueron negativos. Los resultados que se refieren a continuación fueron obtenidos cuando los trofozoitos se fijaron en formaldehido al 4% en metanol absoluto.

En las pruebas que se hicieron con los trofozoitos y la IgG marcada con peroxidasa de personas sanas sin anticuerpos demostrables por CIEF se obtuvo una reacción negativa. El mismo resultado cuando se incubaron los trofozoitos con IgG de personas sanas sin antecedentes clínicos de amibiasis y suero de conejo con anticuerpos anti IgG humana marcados con peroxidasa.

Sin embargo, en algunos experimentos se obtuvo una ligera reacción positiva demostrable por una coloración café amarillenta tanto en el método directo como con el método indirecto al emplear IgG de algunos pacientes sanos sin anticuerpos antiambianos demostrables por contrainmunolectroforésis.

Cuando se llevaron al cabo las incubaciones de trofozoitos, con IgG marcada con peroxidasa de los pacientes con absceso hepático ambiano y con anticuerpos antiambianos demostrables por CIEF se observó una coloración café (reacción positiva), la cual consistía en un precipitado

fino sobre la superficie del trofozoito (Fig. 9). Cuando se incubaron los trofozoitos con IgG humana anti E. histolytica no marcada y suero de conejo con anticuerpos anti IgG humana conjugados con peroxidasa, se obtuvo una reacción fuertemente positiva consistente en precipitado de color café oscuro sobre los trofozoitos (Fig. 10).

En todas las incubaciones en que la reacción citoquímica para actividad de peroxidasa se realizó sin substrato (H_2O_2) en el medio, los resultados fueron negativos.

Cuando se incubaron los trofozoitos con IgG humana antiambiana sin marcar con peroxidasa, y posteriormente con IgG humana antiambiana marcada con peroxidasa, en la reacción citoquímica con el medio completo de Karnovsky los resultados fueron también negativos.

Todos los experimentos orientados a investigar actividad de peroxidasa endógena en trofozoitos de E. histolytica fijados y sin fijar fueron negativos.

Microscopía Electrónica.-

En todos los experimentos realizados para demostrar la reacción positiva de combinación de los anticuerpos con los sitios antigénicos de super

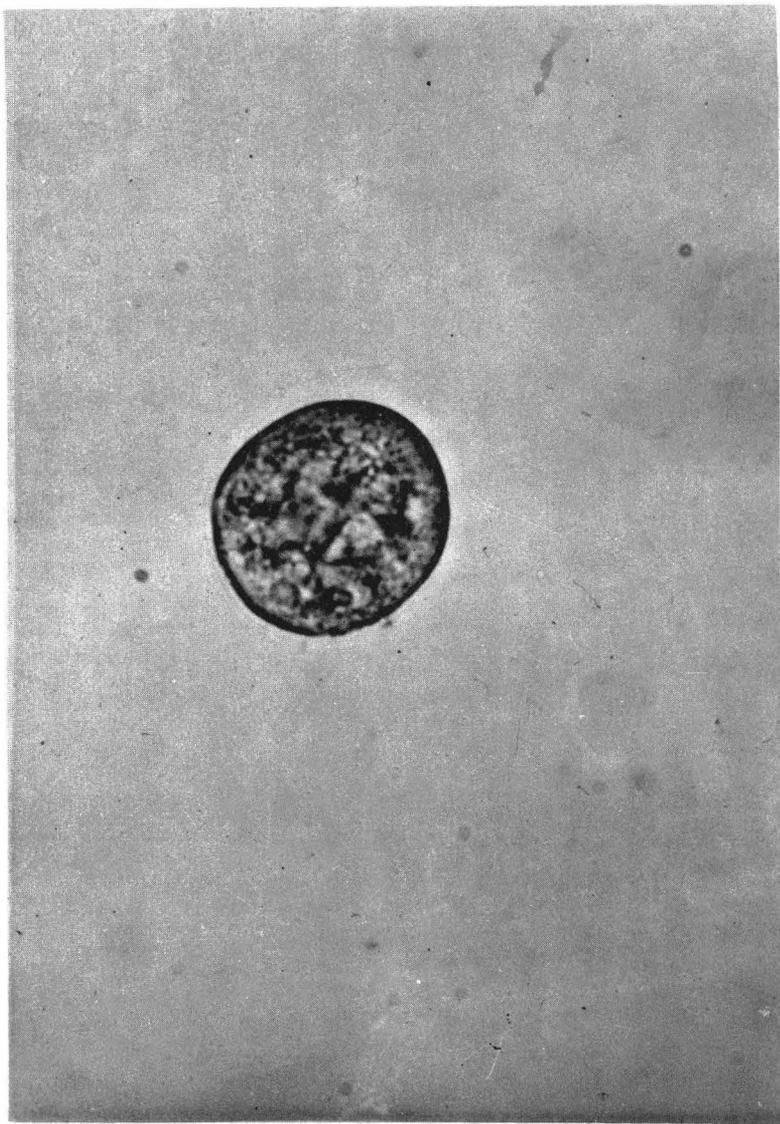


FIGURA No. 9.- Resultado positivo de la reacción directa al incubar trofozoitos de E. histolytica con IgG humana antiamebiana conjugada con peroxidasa y revelada su actividad por métodos citoquímicos (400x).

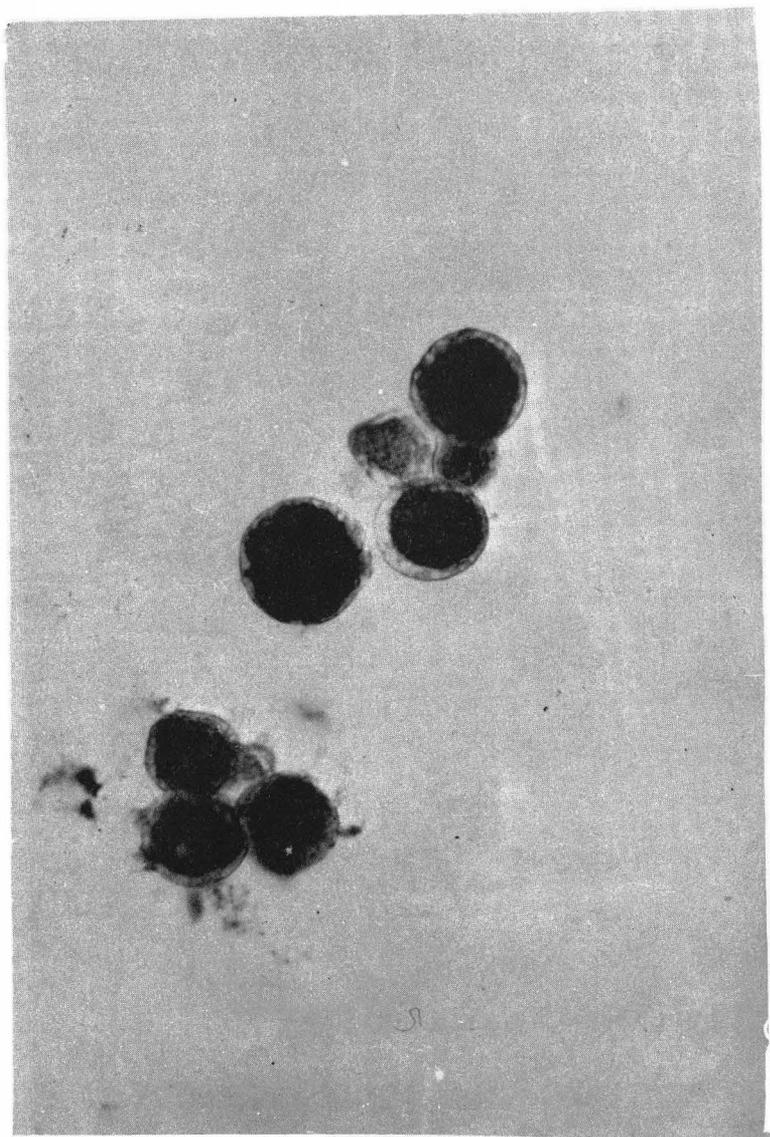


FIG. No. 10.- Resultado positivo de la reacción indirecta al incubar trofozoitos de E. histolytica con IgG humana anti-tiamibiana sin marcar y posteriormente incubados con anticuerpos de conejo anti-IgG humana conjugados con peroxidasa y revelada su actividad por métodos citoquímicos (380x).



FIG. No. 11.- Resultado negativo de la reacción de bloqueo de sitios antigénicos de superficie al incubar los trofozoitos con IgG humana anti*amibiana* no marcada y después de lavarlos, incubarlos con IgG humana anti*amibiana* conjugada con peroxidasa para llevar al cabo la reacción citoquímica (800x).

ficie de los trofozoitos de E. histolytica, se identificó el producto de reacción de la peroxidasa. Dicho producto de reacción se identificó como material electrodenso granular dispuesto inmediatamente por fuera de la membrana plasmática de los trofozoitos y fué más abundante en los experimentos de la reacción indirecta (Fig. 13) que en los correspondientes a la reacción directa (Fig. 12). En la reacción directa se incubaron los trofozoitos con IgG humana anti E. histolytica conjugada con peroxidasa; la reacción citoquímica se llevó al cabo con medio de Karnovsky completo. En la reacción indirecta, los trofozoitos se incubaron con IgG humana anti amiba no marcada y después se incubaron con anticuerpos de conejo anti IgG humana, marcados con peroxidasa; la reacción se hizo con el medio completo de Karnovsky para demostración de actividad de peroxidasa.

Cuando las reacciones citoquímicas se llevaron al cabo en el medio de Karnovsky sin substrato (H_2O_2), no se observó el producto de reacción sobre los trofozoitos (Fig. 14).

Cuando los trofozoitos se incubaron con IgG humana anti E. histolytica sin conjugar y después de lavarlos se incubaron nuevamente con IgG humana anti amiba, ahora sí conjugada con peroxidasa, después de la



FIG. No. 12.- Micrografía electrónica de parte de un trofozoito sin teñir en cuya superficie se aprecia el producto de reacción electrodenso correspondiente a la actividad de peroxidasa conjugada a los anticuerpos antiamebianos (IgG humana) (108,000 \times).

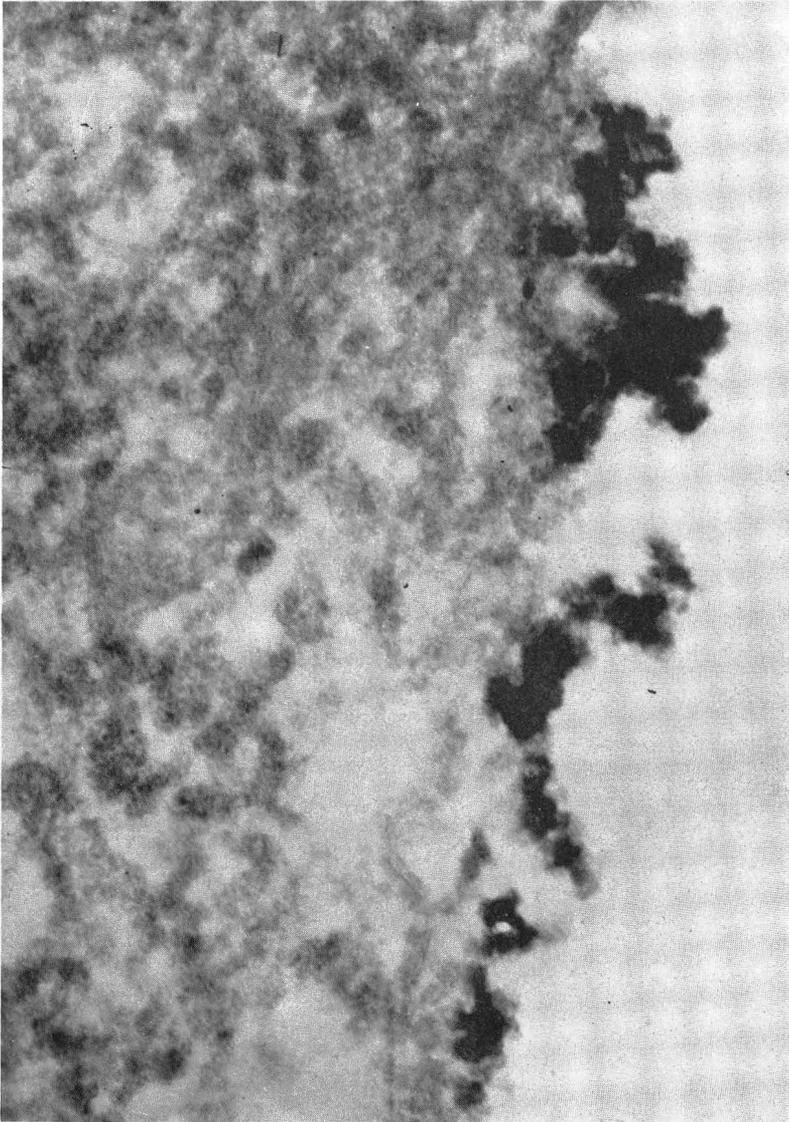


FIG. No. 13.- Micrografía electrónica de trofozoito de E. histolytica que muestra el producto de reacción de la peroxidasa en el área correspondiente al glucocálix de los trofozoitos. Corte sin teñir (113,000x).

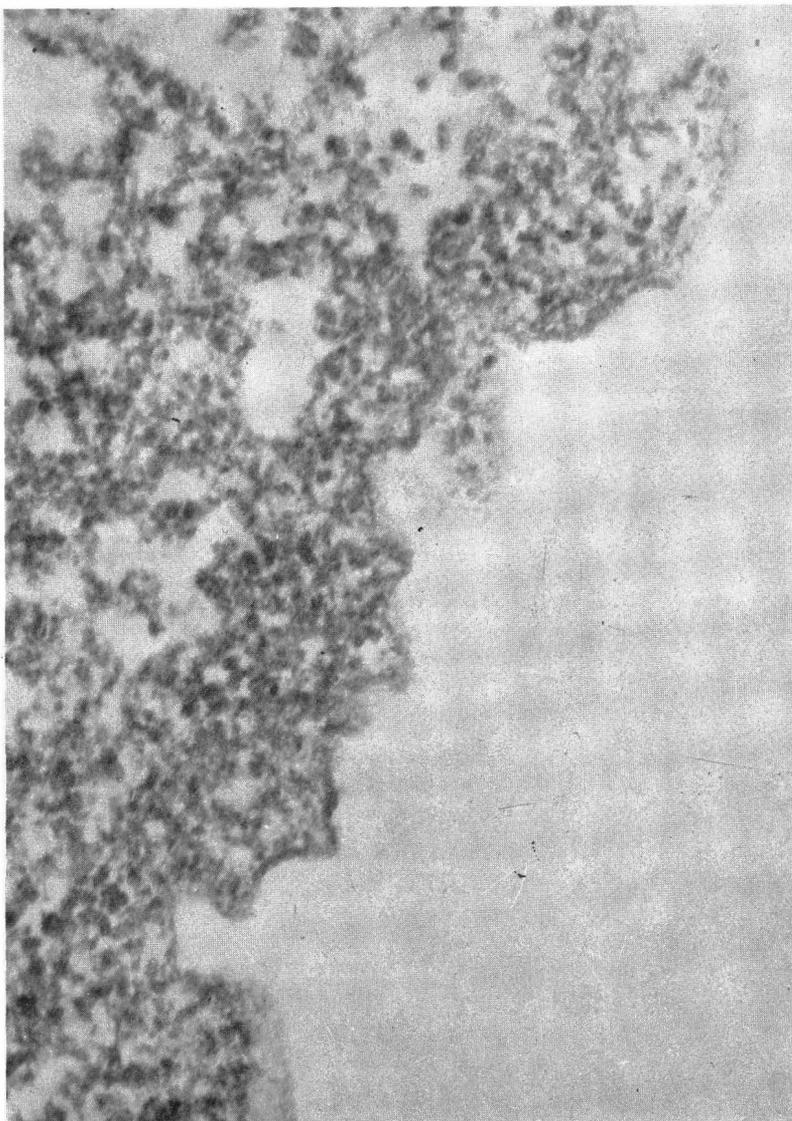


FIG. No. 14.- Ausencia de precipitado electrodenso por ausencia del substrato (H_2O_2) en el medio citoquímico de Karnovsky para revelar actividad de peroxidasa conjugada a los anticuerpos. Corte sin teñir (100,000x).

reacción citoquímica, no se observó producto de reacción en la superficie de los trofozoitos (Fig. 15).



FIG. No. 15.- Ausencia de producto de reacción en la superficie de los trofozoitos al ser incubados con IgG humana antiambiana no marcada y después de lavarlos, incubarlos con IgG humana antiambiana conjugada con peroxidasa. La reacción citoquímica se realizó en medio completo de Karnovsky y los cortes se examinaron sin teñir (100,000x).

CAPITULO IV

D I S C U S I O N:

Los estudios inmunológicos que se han realizado sobre la E. histolytica han sido fundamentalmente con fines de diagnóstico (5-15). Para tener un mayor conocimiento sobre la inmunidad celular y humoral que la E. histolytica induce en el huésped se necesita tener una información más completa sobre la localización de los sitios antigénicos de la amiba, los cuales son los responsables de la reacción inmunológica. Esto hace necesario la elaboración de estudios ultraestructurales sobre los determinantes antigénicos de la amiba que tienen el primer contacto con el huésped. Ellos son los antígenos de superficie y que se encuentran principalmente en los elementos del glucocálix, así como en la membrana plasmática (43,45).

Los estudios que se han hecho sobre la membrana celular y sus componentes son relativamente pocos en comparación con los que se han llevado al cabo sobre la organización interna de la célula y sus elementos. Las investigaciones sobre la membrana celular han sido fundamentalmente relacionadas con los lípidos, proteínas y mucopolisacáridos que la integran

(46-50). Estos últimos fueron identificados en 1963 por Bennet en las células de mamíferos quien les denominó glucocálix, para referirse a la capa exterior aplicada sobre la lámina externa de la unidad de membrana (49). Esta capa de mucopolisacáridos ha sido demostrada en una gran variedad de tejidos animales y en algunos tipos de amibas como Amoeba proteus (51) Chaos chaos (51, 52) y en E. histolytica (53, 54) utilizando diversos colorantes como rojo y violeta de rutenio, así como azul alciano y lantano en microscopía óptica y electrónica.

En la E. histolytica el glucocálix está formado por 2 capas. Una capa amorfa colocada inmediatamente sobre la lámina externa de la unidad de membrana, que mide 150 \AA , es muy densa y homogénea. La capa más externa es menos densa, de aspecto "deshilachado" finamente granular y de 500 \AA de espesor (53, 54). Estas mucoproteínas constituyen en términos de peso seco una pequeña porción de los elementos moleculares de la membrana; pero en cuanto a su función son de importancia primordial, ya que las glucoproteínas de esa capa exterior están relacionadas con los fenómenos de reconocimiento celular, adhesividad y con la antigenicidad de la membrana de las

células.

En base a lo anterior, puede pensarse que el glucocálix de la E. histolytica en su forma vegetativa desempeña un papel importante en la biología del parásito como en los mecanismos de adhesividad, fagocitosis, pinocitosis y antigenicidad.

Winzler mencionó que los glucolípidos intervienen en forma importante en la expresión antigénica de los grupos sanguíneos A,B, H (55) y Lewis, en tanto que las glucoproteínas determinan la antigenicidad de los grupos M y N (56, 57). En las células de ratón, el glucocálix se encuentra enmascarando parcialmente los aloantígenos H₂ (53). Ello habla en favor de la importancia que tienen los componentes glucolipídicos en la expresión antigénica de la célula.

En los trofozoitos de E. histolytica es posible que varias de las determinantes antigénicas que inducen la formación de anticuerpos y/o células sensibilizadas en el huésped, se encuentran en el glucocálix.

La localización de los antígenos superficiales y su composición son importantes ya que éstos son los primeros en tener relación con el huésped y son, en gran parte, responsables del tipo de la reacción inmunológica.

ca que se desarrolla en el paciente.

La localización de antígenos superficiales en amibas se llevó al cabo por Wolper y O'Neill utilizando anticuerpos marcados con fluoresceína (59), observándose también que existe un recambio importante en la cubierta exterior de la amiba. Con respecto a la E. histolytica se tiene información de un trabajo que demuestra la presencia de los antígenos intracelulares pero ausencia de antígenos superficiales (29). Este último resultado se debió probablemente a una preservación inadecuada de la capa exterior o glucocálix, la cual requiere una fijación adecuada. Los antecedentes que se tienen de la existencia de antígenos superficiales de la amiba son indirectos, tales como las reacciones en gel precipitación (6), aglutinación (12) inmunoelectroforésis (8), CIEF (11) e inmunofluorescencia (9-13) (15), que se han hecho con fines puramente diagnósticos.

En el presente trabajo se llevó al cabo la localización de los anticuerpos contra de glucocálix por medio de reacciones de inmunofluorescencia y de marcaje con peroxidasa para microscopía óptica y electrónica. Para ello, se separó la IgG de los sueros de pacientes con absceso hepático

Se llevaron al cabo reacciones de inmunofluorescencia directa e indirecta las cuales mostraron la especificidad de la IgG en los trofozoitos de E. histolytica y la presencia de antígenos de superficie, por medio de microscopía óptica.

Estas pruebas se hicieron a la vez con el propósito de utilizarlas como testigos para los mismos casos en que el material se trató para ser estudiado en microscopía electrónica.

Para la localización topográfica de los antígenos se han utilizado enzimas conjugadas con anticuerpos (60, 61, 62). La enzima de estos conjugados es detectable por medio de una reacción en que se formen productos de reacción visibles. Las enzimas utilizables son las fosfatasa alcalina y ácida, tirosinasa, glucosa oxidasa y peroxidasa (62). Esta última se utilizó en el presente estudio, como marca de la IgG para la localización de los antígenos superficiales de la E. histolytica por su ventaja de observarse con el microscopio óptico y electrónico.

Para microscopía óptica se debe poner la enzima en contacto con la 3,p,p diaminobenzidina en presencia de H_2O_2 , la oxida, produciéndose un precipitado café, el cual se deposita alrededor de los sitios donde se

se encuentra la enzima. Estos conjugados se han utilizado en microscopía electrónica mediante una postfijación con tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio, lo cual aumenta el contraste del producto de reacción.

Esta técnica con peroxidasa es muy útil, ya que se pueden observar los resultados de la prueba en el fotomicroscopio y si el sistema es adecuado se sigue el procedimiento para microscopía electrónica en el cual la reacción es visible por la electrodensidad del producto de reacción de la peroxidasa (65).

Otro tipo de marca para microscopía electrónica es la ferritina. Es útil para localización de antígenos superficiales porque su penetración en las células es escasa por el gran tamaño de su molécula (650,000 PM) (64). Sin embargo, los resultados sólo son observados en el microscopio electrónico. La peroxidasa tiene mayor penetración en las células debido a que su molécula es más pequeña (40,000 PM) (63).

Teniendo en cuenta lo anterior, se utilizó para la localización de los anticuerpos sobre la superficie de la E. histolytica el marcaje con peroxidasa.

Las reacciones directas de inmunofluorescencia y de peroxidasa fueron de gran utilidad ya que el marcaje se hizo directamente sobre los anticuerpos antiambianos. Los resultados de estas pruebas fueron francamente positivas cuando se incubaron los trofozoitos de E. histolytica con la IgG marcada de pacientes con absceso hepático ambiano. Ello indica que se efectuó la reacción antígeno-anticuerpo, comprobándose de esta manera la existencia de anticuerpos antiambianos en la IgG utilizada y la presencia de antígenos en la superficie de la amiba.

Conforme se aumento la dilución de la IgG marcada con ITF, las reacciones mostraron una disminución paralela de la intensidad de fluorescencia. Ello se debió a que al diluir los anticuerpos antiambianos la reacción era más débil.

Los resultados negativos de las reacciones directas por inmunofluorescencia y peroxidasa con IgG de personas sin amibiasis, muestran la ausencia de anticuerpos detectables por estas técnicas. Ya que no se realizó la reacción antígeno-anticuerpo, ellas sirven como testigos de la especificidad de la reacción.

Para descartar la posibilidad de autofluorescencia, se observaron los trofozoitos sólo con luz ultravioleta. Otros testigos que se

realizaron en las pruebas directas e indirectas de peroxidasa fueron aquellas en las cuales se incubaron los trofozoitos con IgG anti*Amoeba* sin marcar y se revelaron con medio completo de Karnovsky para comprobar la especificidad de la reacción.

Estos testigos consistieron en incubar los trofozoitos con IgG marcada con peroxidasa con anticuerpos anti*Amoeba* y el medio de Karnovsky sin H_2O_2 para comprobar la ausencia de sustrato endógeno en el material empleado. Además se realizaron al mismo tiempo pruebas de inmunofluorescencia indirectas con el propósito de verificar si el método para detectar la IgG sobre la superficie de la *Entamoeba histolytica* era el adecuado.

En las pruebas indirectas de inmunofluorescencia y de peroxidasa la reacción fue más intensa. Los resultados que se obtuvieron fueron los mismos que en las pruebas directas y por lo tanto las conclusiones fueron iguales a las anteriores.

La utilidad de las pruebas indirectas consistió en que sirvieron como testigos adicionales de la especificidad de las reacciones directas. Como se obtuvieron resultados positivos similares por las reacciones de inmunofluorescencia, y por la de peroxidasa, ello indica que la IgG reacciona por la presencia de anticuerpos anti*Amoeba* y no es el depósito inespecífico del con-

jugado sobre los trofozoitos. Se hicieron otros testigos en los cuales se incubaron los trofozoitos sin IgG con el suero de conejo o cabra anti IgG humana, cuyos resultados negativos demuestran que para que se efectúe la reacción es necesario la presencia de anticuerpos antiambianos.

Cuando se incubaron los trofozoitos con IgG de una persona sin amibiasis y sin anticuerpos antiambianos demostrables por CIEF en las reacciones directas e indirectas de peroxidasa éstas dieron una reacción débilmente positiva. Ello se explica porque esta persona pudo tener anticuerpos antiambianos en pequeña cantidad, no demostrables por CIEF; pero evidenciales por la mayor sensibilidad de marcaje del anticuerpo con peroxidasa.

Los antígenos pueden encontrarse ya sea en la membrana celular y/o en el glucocálix que la recubre. Por su ubicación superficial son los primeros determinantes antigénicos que tienen relación con el huésped.

El hecho de observar una mayor cantidad de producto de reacción sobre la superficie de los trofozoitos en los que se llevó al cabo la

reacción indirecta, es explicable pues en estas condiciones se tiene un mayor número de moléculas conjugadas con peroxidasa fijas a los elementos celulares. Este hecho fué bien conspicuo en el material estudiado con microscopía óptica y con microscopía electrónica en el presente trabajo.

Tomando en consideración que en trabajos previos había sido observada una gruesa capa de glucocálix en los trofozoitos de Entamoeba histolytica (53, 54) y que las glucoproteínas que la constituyen pueden ser solubles en medio acuoso, se empleó un fijador en solución no acuosa. Este fué una solución de formaldehído al 4% en metanol. Después de ésto pudo observarse que las reacciones de peroxidasa fueron positivas mientras que otras pruebas paralelas realizadas con amibas fijadas en solución acuosa de glutaraldehído fueron negativas (Tabla III).

De esta manera puede inferirse que por lo menos algunos de los antígenos de la Entamoeba histolytica son superficiales y posiblemente se encuentran localizadas en el glucocálix. Como es sabido la respuesta inmune puede adoptar diferentes modalidades en función de la estructura química del antígeno, pudiendo ésta ser del tipo celular o humoral. Dentro de esta última la respuesta inmune puede conducir a la eliminación del antígeno del

organismo. En caso de ser de facilitación puede favorecer la permanencia del parásito dentro del organismo. Este último tipo de respuesta inmune conocido como de facilitación inmunológica se caracteriza por la producción de anticuerpos no fijadores de complemento (43) (67-69) Tabla IV.

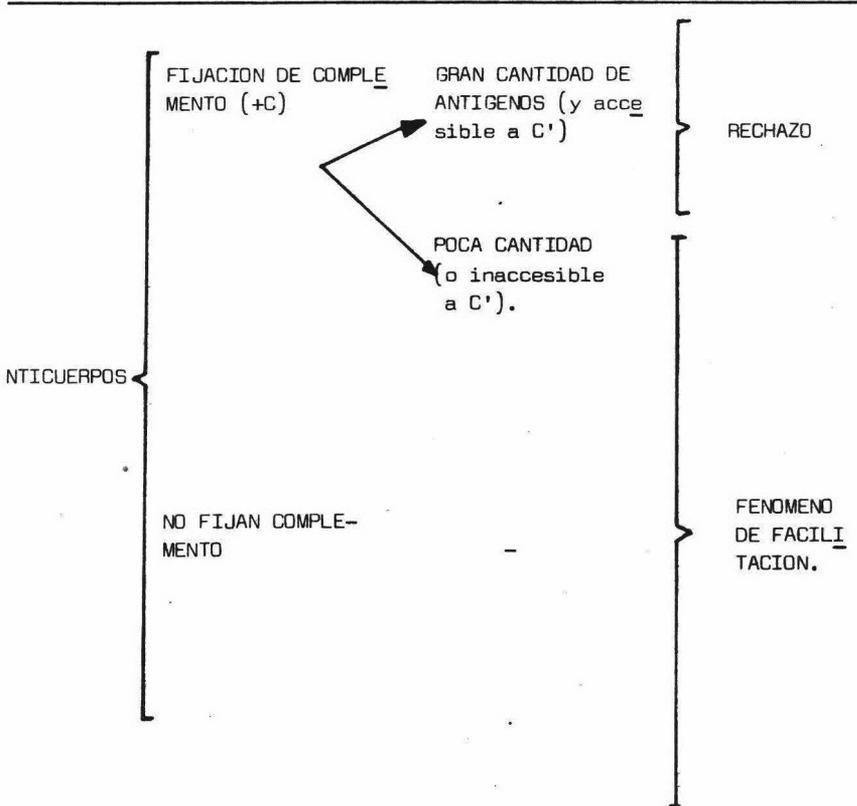
Con el objeto de investigar la capacidad de fijación de complemento se hicieron las reacciones de inmunofluorescencia para detectar la presencia del componente C'_3 del sistema de complemento. Los anticuerpos detectables sí fueron capaces de fijar C'_3 , por lo cual puede concluirse que esta clase de inmunoglobulinas pueden corresponder a las subclases de inmunoglobulinas fijadoras de complemento como son IgG_1 e IgG_3 (71, 72) y que por lo tanto pueden constituir un mecanismo efectivo de defensa del organismo contra el parásito. De no haber sido así los anticuerpos podrían haber correspondido a la de los de facilitación inmunológica. Hasta la fecha esto no se sabe en virtud de que la investigación de anticuerpos antiambianos habitualmente se han efectuado en pacientes ya sea con cuadros clínicos repetidos de amibiasis o bien después de haber sido tratados o de haberse recuperado de algún cuadro invasor de amibiasis. Es deseable que se realice una investigación sistemá-

TABLA IV

MEDIADORES INMUNOLOGICOS
CELULA-INMUNE MEDIADORA

CELULAS BLANCO
(conc. de antígenos
superficiales rele-
vante)

EFFECTO FINAL EN
EL BLANCO.



tica de los anticuerpos antiamibianos a lo largo de las diferentes fases de la historia natural del padecimiento.

Sin embargo es conveniente tomar en cuenta que al menos teóricamente existe la posibilidad de la producción de anticuerpos de facilitación, así como de tipo citolítico antiamibiano, tanto para tratar de explicarnos mejor la variabilidad del cuadro clínico de la enfermedad, como para posibles intentos de desarrollo de procedimientos inmunoprofilácticos que se desarrollen contra las amibas.

R E S U M E N :

Los mecanismos inmunológicos que intervienen en la reacción entre la *Entamoeba histolytica* y el huésped son poco conocidos. Los estudios que se han hecho han sido con fines de diagnóstico, los cuales han mostrado la presencia de un estado de hipersensibilidad retardada y de anticuerpos antiambianos. Esto habla de la existencia de una respuesta inmune celular y humoral en el huésped.

Los determinantes antigénicos de la amiba son los responsables del tipo de inmunidad que se desarrolla en el huésped.

De ellos los antígenos superficiales, por su localización, son los primeros que se relacionan con el huésped y por lo tanto tienen un papel importante en el tipo de inmunidad inducida.

Existen escasos trabajos acerca de la localización estructural de los antígenos superficiales en la *Entamoeba histolytica* y ninguno inmunológico para microscopía electrónica.

La localización de los determinantes antigénicos en las otras células se han hecho con resultados satisfactorios con anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína y peroxidasa.

En el presente estudio, se localizaron los sitios antigénicos de superficie en los trofozoitos de Entamoeba histolytica por inmunofluorescencia e inmunocitoquímica a nivel de microscopía óptica y microscopía electrónica.

Para ello, se utilizaron trofozoitos de la cepa HK-9;NIH de Entamoeba histolytica cultivados axenicamente de acuerdo con el método de Diamond (29).

Para obtener los anticuerpos antiambianos se procedió a separar la IgG de pacientes con absceso hepático ambiano conteniendo anticuerpos antiambianos demostrados por CIEF.

Como testigos se utilizaron sueros de personas sanas sin anticuerpos antiambianos demostrables por la misma técnica. La separación de la IgG, en la cual están contenidos los anticuerpos antiambianos, se hizo por precipitación con sulfato de amonio y purificación por cromatografía en columna con DEAE-celulosa. Para comprobar la pureza de IgG se realizó por inmunoelectroforesis, y para determinar la presencia de IgG y anticuerpos antiambianos en ésta se hicieron pruebas de inmunodifusión por el método de Ouchterlony. La cuantificación de la IgG se llevó al cabo por el método de Lowry.

La localización de los antígenos de superficie se hizo con reacciones directas e indirectas con anticuerpos marcados con fluoresceína y peroxidasa. Los resultados fueron específicos y satisfactorios en los ca sos experimentales y testigos internos.

Cuando las reacciones de peroxidasa se observaron con el microscopio electrónico, la disposición y localización de los sitios antigénicos de superficie, correspondió sensiblemente a la capa de glucocálix descrita previamente.

Los mejores resultados en las reacciones inmunocitoquímicas con anticuerpos conjugados con peroxidasa se obtuvieron cuando el material se fijó con formaldehído al 4% en metanol. Cuando el material se fijó con glutaraldehído en amortiguador de fosfatos, todas las reacciones fueron negativas. Este fenómeno probablemente se deba a que si el glucocálix está formado por glucoproteínas, éstas se disuelvan en el medio acuoso del fijador.

Con el propósito de investigar la capacidad de fijación de complemento por los elementos en estudio, se hicieron reacciones de inmunofluorescencia para detectar la presencia del componente C'3. Los resulta-

dos fueron positivos y ésto hace pensar que probablemente la formación de estos anticuerpos constituye un mecanismo de defensa del organismo contra el parásito.

Probablemente los anticuerpos anti-amibianos aquí detectados por su capacidad de fijar C'_3 , pertenezcan a las subclases IgG_1 , y/o IgG_3 , lo cual requiere de una investigación más detallada al respecto, desde un punto de vista inmunológico.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. El método de peroxidasa como marcador de anticuerpos anti-amibianos es adecuado y sensible para la localización de los sitios antigénicos en la superficie de los trofozoitos de E. histolytica.
2. Para la fijación de los trofozoitos que se estudiaron para la demostración de sitios antigénicos, empleando anticuerpos marcados con peroxidasa, fué más adecuado el uso de formaldehído al 4% en metanol que glutaraldehído en solución acuosa de amortiguador. Esto último probablemente haya sido debido a la posible presencia de glucoproteínas en el glucocálix de los trofozoitos.
3. Los sitios antigénicos superficiales de la Entamoeba histolytica se localizaron por reacciones de inmunofluorescencia en fotomicroscopio y peroxidasa por microscopía de luz y electrónica.
4. La distribución de sitios antigénicos fué semejante a la disposición de la cubierta exterior o glucocálix, que mide de

500-700 Å⁰, informada previamente por Feria y colaboradores (53, 54).

5. Los anticuerpos antiamebianos presentes en la IgG de pacientes con absceso hepático amibiano fijaron el componente C'₃ del complemento.

CAPITULO VI

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

- 1.- Flores, B.F.; Saavedra, S.R. y Velasco, A.F. 1970: Invasión de Entamoeba histolytica a diversos órganos y tejidos en sujetos humanos. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 1: Suppl. 1, 129-146.
- 2.- De León, A.; Perches, A. 1971: Asociación de amibiasis invasora del hígado con otros padecimientos. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 2: Supl. 1, 387, 414.
- 3.- Elsdon-Dew, R. 1968: The epidemiology of amebiasis. Advances in Parasitology. Dewes, B. (Ed.), New York, Academic Press.
- 4.- Aguirre García, J. 1970: Peculiaridades histopatológicas de la lesión amibiana. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 1, Supl. 1: 147-156.
- 5.- Craig, C.F.; 1927: Complement fixation in the diagnosis of infections with Entamoeba histolytica. Journ. of Parasit. 14, (2): 126.
- 6.- Powell, S.J.; Maddison, S.E.; Wilmont, A.J. y Elsdon Dew, R. 1965: Amoebic gel precipitin test, Clinical evaluation in amoebic liver abscess. Lancet 2: 602.
- 7.- Maddison, S.E., Powell, S.J. y Elsdon-Dew, R. 1965: Comparison of the hemagglutinins and precipitins in amebiasis. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 14: 551.
- 8.- Lee, E.; Palacios, O. y Sepúlveda, B. 1970: Inmunoelectroforésis del antígeno amibiano axénico en presencia de suero de paciente con absceso hepático amibiano. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 1, Supl. 1: 91-100.
- 9.- Jeanes, A.L. 1969: Evaluation in clinical practice of the fluorescent amoebic antibody test.: J. Clin. Path. (London) 22, (4): 427-429.
- 10.- Boonpucknavig, S.; Naion, R.C. 1967: Serological diagnosis of amebiasis by immunofluorescence. J. Clin. Path. 20: 5-8.

- 11.- Sepúlveda, B.; Lee, E.; De la Torre, M.; Landa, L. 1971: El diagnóstico serológico de la amebiasis invasora con la técnica de inmunoelectroforésis cruzada. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 2, Supl. 1: 263-268.
- 12.- Robinson, G.L. 1868: The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 62: 285.
- 13.- Mancera, M.R.; Kasuko, K.H.P.; Lehmann, A.Y. 1970: Anticuerpos fluorescentes amibianos por el método fluoroscopia y fluorométrico. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 1, Supl. 1: 107-110.
- 14.- Goldman, M.; Gleason, N.N. and Carver, R.K. 1966: Antigenic analysis of Entamoeba histolytica by means fluorescent antibody, Reactions of the Laredo strain with five anti histolytica sera. Amer. Jour. Trop. Med. & Hyg. 15: 649.
- 15.- Goldman, M. 1959: Microfluorimetric evidence of antigenic difference between Entamoeba histolytica and Entamoeba hartmanni. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 102: 189.
- 16.- Siddiqui, W.A. 1961: Demonstration of antigen antibody reaction with monobacterial culture of Entamoeba histolytica in agar gel and cellulose acetate membrane. J. Parasit. 47: 371.
- 17.- Thompson, P.E.; Graedell, S.K. and Schneider, C.R. 1968: Preparation and evaluation of standardized amoeba antigen from axenic cultures of Entamoeba histolytica. Bull. World Health Org. 39: 349.
- 18.- Michaelis, W. 1930: Über Gewinnung und Keinzüchtung bakterienloser Amöben sowie deren antigenen Eigenschaften. Zentrall. Bakt. I. Abst. Orig. 117: 298.
- 19.- Heinz, H.J.; Mac Nab and Freeman, F. 1958: The role of the bone marrow in antibody production in amoebiasis. S. African J. Med. Sci. 23: 13.

- 20.- Schindey, E.; Maddison, S.E.; Kagan, I.G. 1966: Reactivity of human immunoglobulins in amebiasis. J. Immun. 100: 217.
- 21.- Faust, E.C. 1931: The incidence and significance of infection with E. histolytica in New Orleans and the American Tropics. Amer. J. Trop. Med. 11: 231.
- 22.- Shafer, J.C.; Scantlan, T.M. e Irralu, B. 1961: Observations on cell divisions of Entamoeba histolytica in culture. Am. J. Trop. Med. & Hyg. 10: 107.
- 23.- Stwartzmelde, S.C. 1939: Experimental studies on Entamoeba histolytica in the dog. Am. Journ. 29: 89.
- 24.- Osada, M. 1959: Electron-microscopic studies of protozoa. I. Fine structure of Entamoeba histolytica, Kieo J. Med. 8: 99.
- 25.- Ludvik, J. y Shipstone, A.C.: The ultrastructure of Entamoeba histolytica. Bull. Wld. Hlth. Org., 43: 301, 1970.
- 26.- Feria-Velasco, A. y Treviño, N.: Actividad de fosfatasa ácida en trofozoitos de Entamoeba histolytica. Estudio ultraestructural. Patología (Mex) 3: 125, 1972.
- 27.- Feria-Velasco, A. y Treviño, N.: The ultrastructure of trophozoites of Entamoeba histolytica with particular reference to spherical arrangements of osmiophilic cylindrical bodies. J. Protozool. 19: 200, 1972.
- 28.- Boonpuchnavig, S.G.S.; Lynraven, R.C.; Naion, and Ward, H.A. 1967: Subcellular localizarion of Entamoeba histolytica antigen. Nature (London) 216: 1232-1233.

- 29.- Diamond, L.S. 1968: Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica amebae. J. Parasitology 54: 1047.
- 30.- Nichol, J.C. and Deustch, H.F. 1948: Biophysical studies of Blood Plasma Proteins VII. Separation of Gamma Globulin from the sera of varians animals. J. Amer. Chem. Soc. 70: 80.
- 31.- Peterson, E.A., and Sorber, H.A. 1956: Chromatography of proteins I.J. Am. Chem. Soc. 78: 751.
- 32.- Stanworth, D.R.: 1960. A rapid method of preparing pure serum Gamma Globulin. Nature 188: 156.
- 33.- Duchterlowy, O. 1968: Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. Am. Arbor Science Publishier, Ann. Arbor, Michigan.
- 34.- Scheidegger, J.J. 1955: Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse, Intern. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 7: 103.
- 35.- Lowry, O.H.; Nira, J.; Rosebrough, A.; Lewis, F. 1951: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265.
- 36.- Goldman, M. 1968: Fluorescent antibody methods. Academic Press. New York.
- 37.- Cherry, W.B., Goldman Hand Carski, T.R. 1960: Fluorescent antibody techniques in the diagnosis of communicable diseases. U.S. Rebllic. Health Ser. Plub. 729.
- 38.- Nakane, P.K.; Pierce, G.B. 1967: Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigene. J. Cell. Biol. 33: 307-318.

- 39.- Palade, G.E. 1952: A study of fixation for electron microscopy. S. Exp. Med., 95: 285.
- 40.- Luft, J.H. 1961: Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2: 409.
- 41.- Peachy, L.D., 1958: Thin sections. I.- A study of section thickness and physical distortion produced during microtomy. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4: 233.
- 42.- Venable, J.H. y Cooggeshall, R.E., 1965: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. S. Cell Biol. 25: 407.
- 43.- Hellström, K.E., Hellström, I., Brawn, J., 1969: Abrogation of cellular immunity to antigenically foreign mouse embryonic cell by a serum factor. Nature 224: 914.
- 44.- Currie, G.A. 1970: The conceptus as an allograft. Immunological reactivity of the mother. Proc. Roy. Soc. Med. Ser. B. 63: 61.
- 45.- Bradbury, S.; Billington, S.W.D.; Kirby, D.R.S. 1969: Surface mucin of human trophoblast. Am. J. Obst. Gynecol. 104: 416.
- 46.- Sjöstrand, F.S. y Barajas, L. 1968: Effects of modifications in conformation of protein molecules on structure of mitochondrial membranes. J. Ultrastruc. Res. 55: 121.
- 47.- O'Brien, J.S. y Sampon, E.I. 1965: Fatty acid and aldehyde composition of the major brain lipids in normal gray matter, with matter, and myelin. J Lipid Res. 6: 545.
- 48.- Maddy, A.H. y Malcolm, B.R. 1965: Protein conformation in the plasma membrane. Science 150: 1616.

- 49.- Bennett, H.S. 1963. Morphological aspects of extracellular polysaccharides. J. Histochem. Cytochem. 11: 14.
- 50.- Rambourg, A.; Neutra, M. y Leblond, C.P. 1966: Presence of a "cell coat" rich in carbohydrate as the surface of cells in the rat. Anat. Rec. 154: 41.
- 51.- Szubinska, B. y Leblond, J.H. 1971: Ruthenium red and violet. II. Fine structure of the plasma membrane and extraneous coats in amoebae. (A. proteus and Chaos chaos). Anat. Rec., 171: 417.
- 52.- Nachmias, V.T. 1966: A study by electron microscopy of the formation of new surface by Chaos chaos. Exptl. Cell Res. 43: 583.
- 53.- Feria-Velasco, A.; Treviño, G.M.N. 1972: Mucopolisacáridos en el glicocálix de Entamoeba histolytica, estudio citoquímico de alta resolución. Arch. Inv. Méd. (Méx). 3, Supl. 303.
- 54.- Gutiérrez-Pastrana, M.D.: Estudio citoquímico ultraestructural con correlación bioquímica de la cubierta exterior de trofozoitos de Entamoeba histolytica. Tesis Recepcional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. 1973.
- 55.- Winzler, R.J. 1970: Carbohydrates in cell surfaces. Int. Rev. Cytol., 29: 77.
- 56.- Marcus, D.M. 1969: The ABO and Lewis blood group system. Immunochemistry, genetics, and relation to human disease. New Eg. J. Med. 280: 994.
- 57.- Springer, G.F. y Ansell, N.J. Proc. Nat. Acad. Sci. 44: 182.
- 58.- Akira Shimada y Stanely G. Nathenson 1971: Removal of Neuraminic Acid from H-2 Alloantigens without Effect of Antigenic Reactivity. J. Immunol. 107: (4) 1197-1199.

- 59.- Wolpert, L. y O'Neill C.H. 1962: Dynamics of the membrane of Amoeba proteus studied with labelled specific antibody. Nature. 196: 1261-1266.
- 60.- Avrameas, S. 1968: Dectection d' antigenes á L' aide d' enzymes. Bull. Soc. Chim. Biol. 50: 1169.
- 61.- Avrameas, S. 1969: Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugate for the detection of antigens and antibodies. Immunochemistry 6: 43-52.
- 62.- Wicker, R. & Avrameas, S. 1969: Localization of viral antigens by enzyme-labelled antibodies. J. gen. Virol. 4: 465.
- 63.- Leduc, E.H.; Wicker, S.; Avrameas y Bernhard, W. 1969: Ultrastructural localization of SV 40 T Antigen with Enzyme-labelled antibody. J. gen. Virol. 4: 609-614.
- 64.- Clyne, H.D.; Stephen, H.; Norris, R. 1973: Antibody enzyme conjugates. The preparation of intermolecular conjugates of horseradish peroxidasa and antibody and their use in immunohistology of renal cortex. J. Histochemical and Cytochemistry, 21: 233-240.
- 65.- Bretton, R.; Teryckt y Avrameas, S. 1972: Comparison of peroxidase and ferritin labelling of cell surface antigens. Exp. Cell. Rech. 71: 145-155.
- 66.- Oshiro, L.S.; Rose, H.M.; Morgan, C. & Hsu, K.C. 1967: The localization of SV₄₀-induced neoantigen with ferritin-labelled antibody. Virology 31: 183.
- 67.- Kalias, N.; Kandutsch, A.A. 1956: Acceptance of hemografts by mice injected with antiserum. I. Activity of serum fractions.
- 68.- Hutchin, P. 1968: Mechanisms and functions of immunological enhancement. Surg. Gynec. Obst. 126: 1331.

69.- Hellström, I., Helleström, K.E. 1971: Some aspects of the immune defense against cancer. II. In vitro studies on human tumors. Cancer 28: 1269.

70.- Ruddy, S., Gigli, I. y Austin, F.K.: 1972: The complement system of man. New Engl. J. Med. 287: 489-642.

71.- Bellanti, J.A. 1967: Immunology. Ed. Ed. W.B. Saunders Co.: 103: 104.

72.- Voisin, G.A. 1971: Immunological facilitation a Broadening of the concept of the Enhancement Phenomenon. Progress in Allergy, 15: 328-485.