



03062

18
2ej-

Universidad Nacional Autónoma de México

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE *Entamoeba histolytica*

Tesis que para obtener el grado de Maestra en
Investigación Biomédica Básica

presenta

PATRICIA DE LA TORRE

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D.F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

LISTA DE FIGURAS.....ii

LISTA DE TABLAS.....iii

ABREVIATURAS.....iv

INTRODUCCION.....1

ANTECEDENTES Y OBJETIVO.....8

MATERIAL Y METODOS.....10

RESULTADOS.....20

DISCUSION.....30

BIBLIOGRAFIA.....56

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1.	Análisis electroforetico en gel de poliacrilamida-SDS de las fracciones subcelulares de trofozoítos de <u>E. histolytica</u>	40
Figura 2.	Inmunoelctrotransferencia de un lisado total de <u>Entamoeba histolytica</u>	41
Figura 3.	Inmunoelctrotransferencia de antígenos de la membrana plasmática de <u>E. histolytica</u>	42
Figura 4.	Inmunoelctrotransferencia de antígenos de la membrana plasmática de <u>E. histolytica</u>	43
Figura 5.	Inmunoelctrotransferencia de antígenos del citosol de <u>E. histolytica</u>	44
Figura 6.	Efecto de la oxidación de carbohidratos en el reconocimiento de los antígenos de la membrana plasmática de <u>E. histolytica</u>	45
Figura 7.	Efecto de la oxidación de carbohidratos en el reconocimiento de los antígenos de la membrana plasmática de <u>E. histolytica</u>	46
Figura 8.	Inmunoprecipitacion de proteínas de <u>E. histolytica</u> marcadas biosintéticamente con [³⁵ S]metionina, con sueros de pacientes.....	47
Figura 9.	Inmunoprecipitación de proteínas de <u>E. histolytica</u> marcadas biosintéticamente con [³⁵ S]metionina, con sueros de pacientes.....	48
Figura 10.	Inmunoprecipitación de proteínas de <u>E. histolytica</u> marcadas biosintéticamente con [³⁵ S]metionina, con sueros de pacientes.....	49
Figura 11.	Reacción de oxidación de carbohidratos por peryodato.....	50

LISTA DE TABLAS.

Tabla I. Rendimiento de proteínas en las fracciones subcelulares de trofozoítos de E. histolytica.....51

Tabla II. Proteínas de la membrana plasmática reconocidas con mayor frecuencia y mayor intensidad por el suero de pacientes.....52

Tabla III. Proteínas del citosol reconocidas con mayor frecuencia y mayor intensidad por el suero de los pacientes.....53

Tabla IV. Antígenos marcados con [³⁵S]metionina precipitados con mayor frecuencia por el suero de los pacientes.....54

Tabla V. Comparación de los antígenos identificados por el suero de los pacientes por los métodos de Western blot e inmunoprecipitación.....55

ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica bovina
Con A	Concanavalina A
DTT	Ditiotreitol
DMSO	Dimetilsulfóxido
PBS	Buffer de fosfatos salino
PD	Buffer de fosfatos con 0.27M NaCl
PHMB	p-hidroximercuribenzoato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPO	2,5-difeniloxazol
P II	Membranas internas
P III	Membranas no vesiculadas
P IV	Membranas plasmáticas
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SN II	Componentes solubles
SSI	Solución salina isotónica

CARACTERIZACION ANTIGENICA DE Entamoeba histolytica

Tesis de Maestría presentada por Patricia De la Torre.

RESUMEN

Para identificar los antígenos de Entamoeba histolytica, que inducen inmunidad humoral en pacientes con amibiasis invasora, se estudio por medio de inmunoelectrotransferencia (1) y por inmunoprecipitación de antígenos marcados biosintéticamente con [³⁵S]metionina la especificidad antigénica de los anticuerpos en el sueros de pacientes convalcientes de amibiasis invasora.

Se prepararon membranas plasmáticas, membranas internas y citosol de trofozoítos de la cepa axénica HMI:IMSS (2), para establecer la localización subcelular de los antígenos detectados por estos sueros. Además, se determinaron epítopes glicosídicos en los antígenos por medio de la oxidación con peryodato (3).

En esta tesis se demostró que un gran número de componentes de E. histolytica inducen respuesta inmune humoral. En un lisado total de trofozoítos se detectaron 27 polipéptidos antigénicos con Nr de 21,000 a 167,000. La membrana plasmática es muy importante en el reconocimiento del parásito por el sistema inmune del paciente; en esta se encuentra la mayoría de las especies antigénicas del lisado total, mientras que el citosol es menos complejo antigénicamente. Los anticuerpos de los 11 pacientes estudiados reaccionaron con prácticamente los mismos antígenos membranales, siendo muy notable la reactividad con 9 antígenos de 167,156, 82, 63, 49, 43,37, 33, y 30 kDa. Por radioinmunoprecipitación de lisados totales se encontró que antígenos de 164, 152, 120, 42, 41, 37, 32 y 27 kDa fueron los que reaccionaron mas fuertemente. Muchos de los antígenos membranales son glicopro-

teínas cuyas porciones glicosídicas son, en general, inmunodominantes.

De los antígenos que hemos identificado, los más inmunogénicos son candidatos para ser más ampliamente caracterizados y posteriormente ser utilizados en el desarrollo de mejores pruebas diagnósticas y de medidas inmunoprolácticas para el control de la amibiasis.

Esta tesis contiene los siguientes capítulos: Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión y Bibliografía.

Bibliografía:

1. Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1979; 76: 4350-4354.
2. Aley, S.B., W.A. Scott and Z.A. Cohn. J. Exp. Med. 1980; 152: 391-404.
3. Woodward, M.P., W.W. Young Jr. and R.A. Bloodgood. J. Immun. Meth. 1985; 78: 143-153.

Handwritten signature or initials

INTRODUCCION

La amibiasis se define como la condición de hospedar al parásito Entamoeba histolytica. Esta enfermedad se considera como un problema de salud mundial (WHO, 1969), debido a que aproximadamente el 10% de la población es portadora del parásito. En México, la amibiasis se encuentra entre las diez primeras causas de muerte; la proporción de población mexicana infectada con Entamoeba histolytica probablemente alcanza el 25 % y el número de muertes anuales oscila entre 10,000 - 30,000, siendo la mayoría entre los 30 y 40 años de edad. El efecto socioeconómico que la amibiasis ejerce sobre una población es más importante que el número de muertes, ya que los infectados más severamente son aquellos que se encuentran en los años de vida económicamente productivos (Walsh, 1986).

BIOLOGIA DEL PARASITO.

Entamoeba histolytica es un parásito protoctista con un ciclo de vida relativamente simple de sólo dos estadios, la forma infectiva es el quiste y la forma vegetativa es el trofozoíto. Su reproducción es por fisión binaria, cada quiste da lugar a un metaquiste de 4 núcleos que a través de una serie compleja de divisiones

nucleares y citoplásmicas da lugar a 8 trofozoítos. Este último mide entre 7 y 40 u con un tamaño promedio de 25 u, es uninucleado, esencialmente anaeróbico, carece de mitocondrias, no presenta retículo endoplásmico ni aparato de Golgi. El retículo endoplásmico rugoso no está presente en la forma usual pero su función es reemplazada por ribosomas arreglados en forma helicoidal de longitud pequeña; el retículo endoplásmico liso está poco desarrollado en la amiba, pero puede ser reemplazado por el sistema vacuolar (Martínez Palomo, 1982)

La membrana plasmática del trofozoíto es una unidad trilaminar que consiste en dos capas de 30 A de espesor, rodeando una capa central de 40 A. Esta membrana de 100 A es ligeramente mas gruesa que la de las células de los mamíferos. La membrana plasmática de la amiba esta cubierta por un glicocálix o capa superficial. En la membrana estan intercaladas proteínas que sobresalen a través del glicocálix hacia el medio extracelular de la amiba. (Martínez Palomo, 1982; Lushbaugh y Miller, 1988). La membrana plasmática tiene una gran importancia en la interacción con el sistema inmune del paciente puesto que contiene antígenos fuertemente inmunogénicos (véanse las secciones de Resultados y Discusión). La membrana plasmática amibiana presenta un recambio continuo, esta actividad le facilita la eliminación de ligandos unidos a

su superficie lo cual probablemente permite a los trofozoítos evadir la respuesta inmune. Así se ha observado que utilizando anticuerpos anti-amiba, se induce una redistribución polarizada de antígenos de membrana, seguida de desprendimiento y/o fagocitosis del casquete (Calderón y col., 1980).

INMUNIDAD HUMORAL.

La amibiasis puede presentarse a nivel intestinal o puede complicarse cuando se presenta una diseminación de los trofozoítos hacia el hígado a través de la vena porta o hacia otros tejidos (Ravdin y Guerrant, 1982). La amibiasis extraintestinal puede ser posterior a una fase intestinal o también puede presentarse en pacientes que no han mostrado síntomas previos. En el caso de amibiasis hepática, se han determinado títulos elevados de anticuerpos anti-amiba en el suero. Generalmente, no hay correlación entre la severidad de la enfermedad y el título de anticuerpos, aunque los pacientes con absceso hepático tienden a presentar los mayores títulos de anticuerpos en el suero.

La amibiasis invasora casi siempre produce una rápida respuesta inmune humoral sistémica, los anticuerpos circulantes específicos (principalmente IgG) pueden

detectarse una semana después del comienzo de los síntomas en animales experimentales y humanos (Juniper y col., 1972; Norman y col., 1979) y persisten después que la amibiasis invasora o la infección amibiana subclínica son controladas. Pueden detectarse anticuerpos por IHA o ELISA después de tres años en ausencia de infección recurrente (Krupp y Powell, 1971).

Entamoeba histolytica parece evadir la respuesta inmune humoral del huésped. Un mecanismo importante de evasión de los trofozoítos podría ser la redistribución de los anticuerpos que se unen a su superficie, formando casquetes que son posteriormente internalizados o desprendidos (Calderón y col., 1980). Esta eliminación de los anticuerpos adheridos a la superficie del trofozoito probablemente los protege de la acción citotóxica de los anticuerpos y del complemento.

La propuesta de que existe inmunidad protectora en amibiasis se basa en la baja reincidencia de absceso hepático amibiano (De León, 1970) y en la observación de resistencia a la reinfección en animales de experimentación inmunizados ya sea con trofozoítos o con alguna de sus fracciones (Petri y col., 1991). Por otra parte, la amibiasis intestinal es recurrente aún en presencia de altos títulos de anticuerpos anti-amiba (Harries, 1982) lo que indicaría que los anticuerpos no protegen. Sin

embargo, el papel que desempeña la inmunoglobulina responsable de inmunidad secretora local (sIgA) en esta infección ha sido poco estudiado.

En vista de que la inmunidad humoral no parece ser un factor esencial en la protección contra la reinfección, probablemente sea la inmunidad mediada por células la principal responsable de inmunidad adquirida (revisado en Salata y Ravdin, 1988; Ortiz Ortiz y col., 1990).

DIAGNOSTICO.

Los métodos de diagnóstico de la infección amibiana se basan principalmente en la identificación de quistes y trofozoítos de amiba en las heces o en la detección de anticuerpos específicos en el suero. La identificación microscópica de los organismos en heces debe ser realizada por personal altamente calificado. La disentería producida por amibiasis frecuentemente es difícil de distinguir de otras enfermedades producidas por organismos como Shigella, Campilobacter jejuni, Escherichia coli invasora, Yersinia enterocolítica y Vibrio parahemolyticus. El absceso hepático debe distinguirse de un absceso piógeno, neoplasma hepático o quiste hidatídico.

Se han detectado anticuerpos anti-amiba varios años después de que se presentó la infección y además no todos los pacientes con amibiasis intestinal desarrollan

anticuerpos rápidamente (Juniper y col., 1972; Patterson y col., 1980). Es por estas razones que los diagnósticos serológicos no son completamente indicativos de la enfermedad. Sin embargo, estas pruebas pueden ser útiles como ayuda para el diagnóstico de la amibiasis extraintestinal, especialmente absceso hepático amibiano donde no es posible la detección de los organismos, y también para establecer si enfermedades intestinales tales como diarreas sanguinolentas y colitis crónica son causadas por Entamoeba histolytica (Healy, 1988).

Se ha utilizado un gran número de técnicas inmunológicas para la determinación de anticuerpos anti-amiba; entre las más usadas en la actualidad se encuentran la hemaglutinación indirecta (IHA), la contraelectroforesis y el ELISA. En la mayoría de estas metodologías se utilizan como antígenos, extractos totales de trofozoítos de diferentes cepas preparados de diversas maneras, ya sea por congelación-descongelación, homogeneización, sonicación, etc. lo que trae como consecuencia que ensayos en diferentes laboratorios no sean comparables. Por lo cual, sería ideal que se estandarizaran los antígenos para esas pruebas y que se pudieran seleccionar antígenos comunes a todas las cepas de E. histolytica contra los cuales se produjeran anticuerpos en todos los pacientes.

La demostración de quistes o trofozoítos del organismo constituye un diagnóstico definitivo. Recientemente se han desarrollado pruebas diagnósticas basadas en la detección de antígenos amibianos en heces, empleando anticuerpos monoclonales (Ungar y col., 1985; Del Muro y col., 1987; Merino y col., 1990; Muñoz y col., 1990). Asimismo, también se ha demostrado que la detección en saliva de anticuerpos de secreción (sIgA) dirigidos contra E. histolytica puede indicar la presencia de una infección intestinal causada por este organismo (Del Muro y col., 1990).

ANTECEDENTES Y OBJETIVO

El estudio de los antígenos de parásitos, que inducen una respuesta inmune, es de gran importancia para una mejor comprensión de la relación de estos organismos con los hospederos. Es por esto que la identificación y caracterización de los antígenos que son reconocidos por pacientes durante la infección por E. histolytica podría ayudarnos a entender el papel que desempeña la respuesta inmune en la interacción con este parásito.

Por otro lado, los avances recientes en la tecnología de DNA recombinante, la metodología de anticuerpos monoclonales y los nuevos métodos en análisis bioquímico han impulsado el desarrollo de nuevas vacunas para agentes infecciosos contra los cuales no existen medidas inmunoproliféricas.

En amibiasis, existe un acuerdo general que para su control en países subdesarrollados, donde la morbilidad y mortalidad son muy altas, bastaría con mejorar las condiciones sanitarias y el nivel educacional de la población (Martínez Palomo y Martínez Baez 1983). Sin embargo como esto parece muy difícil de lograrse a corto plazo se ha sugerido como alternativa el desarrollo de un método inmunoproliférico de control (revisado por Salata y Ravdin, 1988; Kretschmer y López Osuna, 1990).

Recientemente se ha propuesto una estrategia para la identificación, caracterización y producción de proteínas de parásitos que son importantes en la relación con el sistema inmune del hospedero (Mitchell, 1984). Si estas proteínas desempeñan un papel preponderante en la resistencia inmune del hospedero al establecimiento del parásito entonces podrían ser usados para la producción de vacunas antiparasitarias compuestas de una o varias moléculas definidas. Para la identificación de estas proteínas que posiblemente induzcan inmunidad protectora se propuso (Mitchell, 1984) el uso de un conjunto de anticuerpos policlonales producidos durante la infección natural de pacientes o de animales experimentalmente infectados y de anticuerpos monoclonales. Además de los anticuerpos, para la identificación de moléculas que inducen inmunidad celular se requiere investigar la especificidad de linfocitos T. Los anticuerpos y linfocitos T se emplean en conjunto con la clonación de genes del parásito la cual permite la caracterización de las secuencias de las proteínas con las tecnologías de análisis de DNA.

El objetivo de esta tesis fue el de identificar y caracterizar parcialmente los antígenos de E. histolytica que inducen inmunidad humoral en pacientes con amebiasis.

MATERIAL Y METODOS.

CULTIVO DE Entamoeba histolytica.

La cepa de Entamoeba histolytica HM1:IMSS, se mantuvo en condiciones axénicas en el medio de cultivo TYI-S33 (Diamond y col., 1978) en tubos de vidrio de 16 x 150 con tapón de rosca o en matraces de plástico para cultivo (Corning 25100-25). Los trofozoítos se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento, esto es, a las 72 horas de cultivo.

MUESTRAS DE SUERO HUMANO.

Los sueros se obtuvieron de pacientes internados en el servicio de Gastroenterología del Hospital General de México de la Secretaría de Salud con la sintomatología y resultados de laboratorio relacionados con absceso hepático amibiano, además los pacientes respondieron al tratamiento con metronidazol. Los sueros presentaron títulos de hemaglutinación entre 1/2,560 y 1/5,120.

PREPARACION DE ANTIGENOS DE Entamoeba histolytica.

Para fraccionar los componentes de E. histolytica se

utilizó el método de Aley (1980). Los tubos o matraces de cultivo, conteniendo trofozoítos en la fase logarítmica de crecimiento, se enfriaron en hielo/agua durante 10 minutos para desprenderlos de las paredes. Los trofozoítos se colectaron por centrifugación a 250 x g por 10 minutos a 4 °C, y se eliminó el sobrenadante, a continuación para eliminar el medio de cultivo, el paquete se resuspendió en 50 ml de buffer de fosfatos 0.019 M pH 7.2 conteniendo NaCl 0.27 M (PD), a 4 °C y se centrifugó de la misma manera; este procedimiento se repitió dos veces. Después del último lavado, el paquete de trofozoítos se resuspendió en PD (20×10^6 trofozoítos/ml) conteniendo $MgCl_2$ 10 mM y se mezcló inmediatamente con un volumen igual de una solución de Con A (1 mg/ml) en el mismo buffer. Las células se dejaron aglutinar durante 5 minutos a 4 °C y después se colectaron por centrifugación a 50 x g por 1 minuto. El sobrenadante se descartó y las células aglutinadas se resuspendieron en 12 ml de buffer tris-HCl 10mM pH 7.5, conteniendo como inhibidores fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2 mM y p-hidroximercuribenzoato (PHMB) 10 mM. Las células se dejaron en esta solución hipotónica durante 12 minutos, posteriormente se fragmentaron con 9 "golpes" en un homogeneizador de vidrio Dounce. La lisis de los trofozoítos se confirmó por microscopía. El homogenado se colocó sobre un gradiente

de dos capas, la inferior consistió en 4 ml de sacarosa 0.58 M y la superior en 8 ml de manitol 0.5 M ambos en buffer tris-HCl 10mM pH 7.5 conteniendo PMSF 2 mM y PHMB 10 mM. Se centrifugó a 250 x g durante 30 min. Posteriormente, el material que permaneció arriba del manitol (SN I) se recuperó y se centrifugó a 40,000 x g por 1 hora para separar las moléculas solubles (SN II) de fragmentos membranales pequeños y vesículas (P II). Los fragmentos grandes de membrana plasmática y restos celulares se obtuvieron en el fondo del tubo (P I). Este paquete se resuspendió en 1 ml de buffer tris-HCl 10 mM pH 7.5 conteniendo α -metil manósido 1 M, y se dejó en esta solución durante 40 minutos en hielo, mezclando ocasionalmente. Después, esta suspensión se diluyó en 3 volúmenes de buffer tris 10 mM pH 7.5 y nuevamente se homogeneizó con 80 "golpes" en el homogeneizador Dounce. Este segundo homogenado se colocó sobre 8 ml de sacarosa al 20 % en buffer tris y se centrifugó a 250 x g durante 30 min. Lo que permanece sobre la superficie del gradiente, es la membrana plasmática vesiculada (SN III), la cual se colectó y se concentró por centrifugación a 40,000 x g durante 1 hora. El precipitado (P IV), que es la membrana plasmática, se resuspendió en buffer tris-HCl 10 mM pH 7.5 conteniendo los inhibidores, PMSF 2 mM y PHMB 10 mM. Posteriormente, a las fracciones obtenidas se les determinó

la concentración de proteína.

CUANTIFICACION DE PROTEINA.

La determinación de proteína se llevó a cabo por el método de Bradford (1976), el cual se basa en la reacción de la proteína con azul de Coomassie. Se mezcló un volumen de 0.8 ml de diferentes diluciones de la proteína con 0.2 ml de una solución 0.01 % de azul de Coomassie brillante R-250, 4.7% de etanol y 8.5% de ácido fosfórico. La curva estándar se preparó con gamma globulina bovina diluida en SSI a la concentración de 3, 5, 10, y 25 ug/ml. Después de incubar un mínimo de 5 minutos, se midió la densidad óptica a 595 nm. La concentración de la muestra se determinó por interpolación en la curva estándar.

ELECTROFORESIS.

Las fracciones obtenidas por el método de Aley (P II, P III, Pq IV y SN II) se analizaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10 % (Laemmli, 1970). Las muestras a ser analizadas se ajustaron a la concentración deseada en el buffer de muestra de electroforesis (tris 0.1M pH 6.8, glicerol 10%, pironina 0.02%) con una concentración final de SDS al 2 %. Las muestras se redujeron con ditiotreitól (DTT) 0.1 M final y se hirvieron en baño de

agua durante 10 minutos. A continuación las muestras se colocaron sobre el gel de SDS-poliacrilamida, el cual tenía una concentración de 10 % de poliacrilamida en el gel separador y de 3 % en el gel concentrador. Como estándares de peso molecular se utilizaron: fosforilasa B, 94,000; albúmina 67,000; ovoalbúmina, 43,000; anhidrasa carbónica, 30,000; inhibidor de tripsina, 20,100; α -lactoalbúmina, 14,400 (Pharmacia Inc. Piscataway, N.J.).

La electroforesis se llevó a cabo con una corriente de 20 mAmp en el gel concentrador y de 40 mAmp para el gel separador. Al finalizar la electroforesis (aprox. 4 horas), las proteínas en el gel se fijaron y se tiñeron con ácido acético 7.5 %, isopropanol 25 %, Coomassie R - 250 0.025 % o en el caso de ser transferidas, el gel se procesó de manera diferente.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Una vez que las proteínas fueron separadas por electroforesis, se transfirieron a papel de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories Richmond, California) de acuerdo a la técnica de Towbin (1979). La transferencia se llevó a cabo durante 1 hora con una corriente de 1 Amp en la cámara de transferencia IDEA (Idea Scientific Company. Corvallis, Oregon) usando como buffer, tris 0.025 M, glicina 0.19 M,

metanol 20 %. Terminada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó en una solución de PBS conteniendo Tween 20 al 0.3 % y BSA al 3 %, durante toda la noche a 4 °C, con agitación. Al día siguiente, la nitrocelulosa se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0.3 %, se cortó en tiras numeradas y éstas se incubaron con los sueros control y de pacientes con absceso hepático amibiano a una dilución de 1:100 en PBS conteniendo BSA (1 mg/ml), durante toda la noche a 4 °C con agitación. A continuación las tiras se lavaron 3 veces con PBS-Tween y después se incubaron con el segundo anticuerpo (inmunoglobulinas marcadas con peroxidasa anti IgA, IgG, IgM humanas (Cappel Cooper Biochemical, Inc. Malvern, P.A.)) en dilución 1:2,000 en PBS conteniendo BSA (1 mg/ml), durante toda la noche a 4 °C con agitación. Posteriormente, las tiras se lavaron de la manera ya indicada y para revelar el complejo antígeno-anticuerpo, se sumergieron en la solución del sustrato: 4-cloro-1-naftol 0.5%, metanol 17%, PBS 83%, H₂O₂ 0.08%, durante 10-15 minutos. La reacción se detuvo lavando las tiras exhaustivamente con agua destilada. Para confirmar la transferencia de las proteínas, una tira de la nitrocelulosa, se tiñó con amido black (amido black 0.1 %, metanol 45 %, ácido acético 10 %).

OXIDACION DEL ANTIGENO AMIBIANO CON PERYODATO.

Para determinar la naturaleza bioquímica de los epítopes reconocidos por los anticuerpos, los blots se trataron con metaperyodato de sodio para oxidar a los carbohidratos (Woodward y col., 1985). Para este análisis se utilizó la fracción de membrana plasmática (P IV) purificada por el método de Aley (ver sección Preparación de antígenos de E. histolytica). Esta fracción se separó por electroforesis en un gel sin carriles y se transfirió a papel de nitrocelulosa. Después de la transferencia, la nitrocelulosa se bloqueó con PBS conteniendo BSA al 3 % y Tween 20 al 0.3 %, durante toda la noche a 4 °C con agitación. Al día siguiente se lavó 3 veces con buffer de acetatos 50 mM pH 4.5. Posteriormente se cortó en tiras para ser usadas como experimentales (tratadas con peryodato) y control (sin tratamiento de peryodato). Las tiras experimentales se incubaron en una solución de peryodato de sodio en buffer de acetato de sodio 50 mM pH 4.5. Se usaron dos concentraciones de peryodato de sodio: 10 y 20 mM. Las tiras control se incubaron únicamente en el buffer de acetato de sodio. Esta incubación fue de 1 hora en la oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, todas las tiras se lavaron 3 veces con el buffer de acetatos y se dejaron bloqueando en glicina al 1% en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.5 durante toda la noche a 4 °C con agitación. A

continuación, las tiras se lavaron tres veces con PBS-Tween y se procedió a incubarlas con los sueros de los pacientes con absceso hepático amibiano o con los sueros control, ambos a una dilución de 1:100 en PBS-tween-BSA durante toda la noche a 4°C con agitación. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS-Tween y se incubaron con los anticuerpos anti-humano peroxidado a una dilución de 1:2,000 en PBS-BSA, por toda la noche a 4°C con agitación. Finalmente, las tiras se lavaron 3 veces con PBS-Tween y fueron expuestas al sustrato 4-cloro-1-naftol 0.5%, metanol 17%, PBS 83%, H₂O₂ 0.08% durante 10-15 minutos. La reacción se detuvo lavando las tiras con agua destilada.

INMUNOPRECIPITACION DE LOS ANTIGENOS MARCADOS CON L-[³⁵S]METIONINA.

a) Marcaje biosintético de los trofozoítos.

Los trofozoítos fueron marcados radiactivamente con [³⁵S]metionina utilizando un método de marcaje metabólico. Para llevar a cabo el marcaje, se descartaron los trofozoítos no adheridos a la pared del tubo de cultivo y el medio de cultivo que fue eliminado, se sustituyó por medio fresco. Las amibas se despegaron del tubo manteniéndolo durante 10 minutos en hielo, después se colectaron por centrifugación a 250 x g durante 8 min. El

sobrenadante se eliminó y las células ($5-6 \times 10^6$) se resuspendieron en 3 ml de medio de cultivo a 37°C sin suero ni antibiótico. A cada tubo con trofozoítos se le agregaron 600 uCi de [^{35}S]metionina (NEN, 1186 Ci/mmol). Posteriormente los tubos se incubaron a 37°C durante 5 horas, agitándolos ocasionalmente para resuspender a los trofozoítos. Al término de este tiempo, se les adicionaron 6 ul de metionina 10 mM no radiactiva (0.1 mM final) durante 15 min. Después de este tiempo, las amibas se colectaron por centrifugación a 250 x g por 10 min, y el paquete se lavó una vez con PD a 4°C. A continuación, las células se solubilizaron en 400 ul de buffer de inmunoprecipitación (1 ml NaCl 1.5 M, 200 ul tris 1 M pH 7.4, 1 ml EDTA 20 mM pH 8, PHMB 7.2 mg, 500 ul PMSF 0.04 M, 100 ul Tritón X-100, H_2O 7.2 ml) y el lisado se guardó a -70 °C hasta su uso.

b) Inmunoprecipitación.

Previamente a la reacción de inmunoprecipitación, el antígeno amibiano marcado con [^{35}S]metionina y los sueros (experimentales y control), se centrifugaron a 16,000 x g durante 10 minutos para eliminar partículas insolubles. Para la reacción, se mezclaron 100 ul de suero de paciente o control. La reacción se dejó durante 1 hora en hielo con agitación ocasional. Para separar los complejos antígeno-anticuerpo, se agregaron 120 ul de Proteína-A agarosa (BRL, Bethesda Research Laboratories) previamente

lavada 3 veces con PBS a 4°C. Esta incubación se dejó durante 1 hora a 4°C con agitación suave en un agitador circular. Después se lavó 3 veces con PBS conteniendo PMSF 2 mM y PHMB 10 mM con Tritón X-100 al 0.5%, en cada lavado se centrifugó a 16,000 x g durante 1 minuto. El precipitado, conteniendo el complejo Ag-Ac se resuspendió en 50 ul de buffer de muestra con una concentración final de 2% de SDS. Se le agregó DTT (0.1 M final) y se hirvió en baño maría durante 10 min. De estas muestras, se agregaron 35 ul al gel de electroforesis.

c) Fluorografía.

Para localizar a las bandas radiactivas reconocidas por los anticuerpos de los sueros, se siguió la técnica de fluorografía descrita por Laskey (1980). Las proteínas en el gel se fijaron con ácido acético al 10%, metanol al 30% y ácido tricloroacético al 10% (w/v) durante toda la noche. Posteriormente, el gel se deshidrató con DMSO durante 1 hora con cambios de DMSO cada 20 minutos, después el gel se sumergió en una solución de PPO al 22 % en DMSO durante 2 horas con agitación suave. A continuación se eliminó el DMSO enjuagando el gel con varios cambios de agua bidestilada durante 1 hora. El gel se secó al vacío con calor. Finalmente se expuso a una película X-Omat AR (Kodak) durante 3 días a -70 °C.

RESULTADOS

1. AISLAMIENTO DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y OTRAS FRACCIONES SUBCELULARES DE E.histolytica

El aislamiento de los componentes subcelulares de E. histolytica se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Aley (1980). Rutinariamente, para la preparación de estas fracciones subcelulares se utilizaron entre 5 y 15×10^7 trofozoitos de la cepa HM1:IMSS cosechados en la fase logarítmica de crecimiento. Al final de la purificación se obtuvieron 4 fracciones: membranas internas (P II), membranas no-vesiculadas (P III), membrana plasmática (P IV) y componentes solubles (SN II). A cada una de estas fracciones se les determinó la concentración de proteína. Como puede observarse en la Tabla I, los componentes solubles del trofozoito (SN II) fueron los más abundantes constituyendo el 88% de la proteína total. Las membranas internas representaron el 9.9% mientras que únicamente el 1.4% de la proteína total obtenida correspondió a la membrana plasmática. El patrón electroforético de cada fracción en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% se observa en la Figura 1. Las membranas no-vesiculadas (P III), mostraron un total de 28 bandas cuyos pesos moleculares se encuentran entre 180,000 y 20,000 mientras que los

componentes solubles (SN II) presentaron pesos moleculares entre 96,000 y 14,000. En las membranas internas (P II), se observan 24 bandas principales con pesos moleculares de 153,000 a 14,000 y en la preparación de membranas plasmáticas se observan 20 bandas cuyos pesos moleculares están entre 176,000 y 18,000. Es de notarse la ausencia de bandas de alto peso molecular en la fracción soluble y la gran intensidad de una banda de 176 kDa en la preparación de membrana plasmática. Las diferentes fracciones contienen algunas bandas que migran en las mismas posiciones (aunque con diferente intensidad) lo cual podría deberse a componentes comunes en las fracciones. Dichos componentes podrían originarse por contaminación de una fracción con otra o reflejar una composición cualitativa similar de las fracciones.

2. DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS CONTRA E. histolytica EN SUEROS DE PACIENTES CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO MEDIANTE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

a) Estudios con antígeno total de trofozoítos.

En los experimentos iniciales se utilizaron todos los antígenos presentes en un lisado de trofozoítos sin una previa separación en fracciones. Los trofozoítos de E. histolytica cepa HM1:IMSS en la fase logarítmica de

crecimiento se lavaron cuidadosamente para remover las proteínas del medio de cultivo e inmediatamente se resuspendieron en buffer de muestra para electroforesis y se hirvieron durante 10 minutos. Este procedimiento elimina totalmente la proteólisis de los antígenos amibianos que se observa frecuentemente en otras condiciones y permite la obtención de patrones electroforéticos reproducibles y claros.

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos al revelar los blots con los sueros de 11 pacientes y 6 de individuos sanos. Los anticuerpos en los sueros de los pacientes reconocen en total 27 bandas cuyos pesos moleculares van de 21,000 a 167,000; sólo algunas de estas bandas fueron reconocidas por los sueros normales. Los sueros de los pacientes reconocen mas intensamente 13 bandas de: 167, 156, 138, 97, 88, 68, 48, 37, 34, 30, 27 y 22 kDa. Las bandas reconocidas por los sùeros de individuos sanos son las de: 47, 43, 37, 30, 27 y 22 kDa. Asi, aunque algunas bandas son reconocidas tanto por los pacientes como por los sueros de individuos sanos, existen claras diferencias entre los patrones de los blots de ambos grupos, particularmente en la zona de alto peso molecular.

b) Estudios con membranas plasmáticas y componentes solubles de trofozoítos.

Para determinar la localización subcelular de los antígenos amibianos reconocidos por los sueros en el extracto total se hicieron blots con las preparaciones de membranas plasmáticas y de los componentes solubles. Las Figuras 3 y 4 muestran los resultados con las membranas plasmáticas. Los sueros de los pacientes reconocen en el "blot" un total de 25 bandas cuyos pesos moleculares son de 167,000 a 17,000. Las bandas reconocidas mas fuertemente por los sueros son las siguientes: 167, 156, 82, 63, 49, 43, 37, 33 y 30 kDa, siendo muy intensas las de 167, 156, 82 y 37 kDa (Tabla II) . A diferencia de los blots con antígenos totales, en este análisis sólo uno de los 7 sueros de personas sanas dio una señal positiva en el blot, reaccionando muy débilmente con 4 bandas (167, 82-96, 53, 49 kDa).

La Figura 5 muestra los blots con los componentes solubles de trofozoítos donde se observa que los sueros de los pacientes reconocen un total de hasta 19 bandas cuyos pesos moleculares varían de 96,000 a 26,000. Las 6 bandas que son reconocidas fuertemente por mas del 60% de los pacientes, son las siguientes: 96, 72, 69, 45, 40 y 38 kDa (Tabla III). Algunas de las bandas detectadas en estos blots son del mismo peso molecular que las que se observan

en los blots de membrana plasmática (por ejemplo la de 96 kDa). Esto puede ser fortuito o indicar que la fracción soluble está ligeramente contaminada con moléculas de origen membranal (lo cual es mas probable para aquellas bandas que se encuentran poco representadas en los patrones electroforeticos de la Figura 1). Los sueros normales reconocieron muy débilmente a las bandas de 45 y 34 kDa.

En conclusión, en comparaci3n con el citosol, la membrana plasmática del parásito contiene un mayor número de antígenos capaces de inducir la respuesta humoral en pacientes. Además, en las membranas se encuentran antígenos de mayor peso molecular que en la fracción soluble.

c) Estudios con antígenos de la membrana plasmática tratados con peryodato.

Como está demostrado que un gran número de componentes de la membrana plasmática de los trofozoítos son glicoproteínas (Aley, 1980) fue importante determinar la naturaleza química de los epítomos reconocidos en los blots de membrana por los anticuerpos de los pacientes, es decir, si los anticuerpos reconocen a los antígenos por la porción peptídica o carbohidrato. Con este propósito, los antígenos membranales ya transferidos a nitrocelulosa se trataron con peryodato para oxidar a los carbohidratos antes de la reacción con los anticuerpos. Este tratamiento produce rompimiento de azúcares que poseen grupos hidroxilo

vecinos, sin alterar la estructura del polipeptido (Woodward y col., 1985) con la consecuente eliminación de la antigenicidad de las estructuras glicosídicas .

Para este procedimiento de oxidación, se utilizaron dos concentraciones diferentes de metaperyodato de sodio (10 y 20 mM). Los resultados obtenidos con ambas concentraciones fueron idénticos y se muestran en las Figuras 6 y 7. Se encontró gran heterogeneidad en el efecto del peryodato sobre el reconocimiento de antígenos por sueros individuales. En general, todas las bandas detectadas disminuyeron en intensidad, aunque esto no se observó en cada uno de los pacientes. Estos resultados indican diferencias en las poblaciones de anticuerpos en los individuos que reaccionan con el mismo antígeno, es decir, que los anticuerpos de un paciente reaccionan con ciertos epítopes de un antígeno mientras que los anticuerpos de otro paciente reaccionan con epítopes diferentes. Aunque las bandas bajan en intensidad con respecto al control no tratado algunas de éstas continúan siendo evidentes en la mayoría de los blots; entre ellas se encuentran las de 167, 156, 140, 96, 49 y 43 kDa. Por el contrario, otras bandas prácticamente desaparecen en todos los blots como es el caso para las de 30 y 37 kDa. Asimismo, es interesante que el fondo oscuro en los blots se elimina al tratarlos con peryodato antes de la reacción con los anticuerpos, lo que

sugiere que el fondo podría deberse a glicolípidos, glicopéptidos u oligosacáridos que son susceptibles de ser oxidados. En conclusión, estos resultados indican que el complejo mosaico antigénico observado en los blots está compuesto en gran parte por glicoproteínas y que una porción importante de los anticuerpos anti-amiba en los pacientes tienen especificidad para carbohidratos. Sin embargo, no se puede asegurar que la persistencia de bandas después de la oxidación se deba a anticuerpos que reconocen la porción peptídica (lo cual es altamente probable) ya que podrían existir carbohidratos antigénicos en las glicoproteínas que son resistentes a oxidación por peryodato.

3. DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS CONTRA E. histolytica EN SUEROS DE PACIENTES CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO MEDIANTE RADIOINMUNOPRECIPITACION.

La identificación de los antígenos que son reconocidos por los anticuerpos de los sueros de pacientes se realizó también por medio de inmunoprecipitación de antígenos marcados con [³⁵S]metionina. En contraste con el Western blot, en este método el antígeno no ha sido sometido a procesos de desnaturalización y reducción antes de la interacción con los anticuerpos lo cual permitiría

detectar antígenos que fueran reconocidos exclusivamente a través de epítopes topográficos o discontinuos (Berzofsky, 1985). Además al marcar biosintéticamente se descarta la posibilidad de que alguno de los antígenos identificados por Western blot pudiera originarse del medio de cultivo. También, al utilizar un aminoácido para el marcaje se asegura que los antígenos identificados son de naturaleza proteica.

a) Marcaje biosintético de los trofozoítos.

Primeramente, se determinaron las condiciones óptimas para lograr la incorporación de [³⁵S]metionina en las proteínas del trofozoíto. Generalmente, los marcajes metabólicos se realizan en medios de cultivo carentes del compuesto a ser usado como precursor radioactivo. Sin embargo, como no existe un medio totalmente definido para el cultivo axénico de los trofozoítos, se investigaron las condiciones para lograr un buen marcaje en el medio usual TYI-S-33 empleando bajas cantidades de [³⁵S]metionina .

Inicialmente , se encontró que la incubación con 200 uCi de [³⁵S]metionina/ml por una hora era suficiente para marcar la mayoría de las proteínas del trofozoíto, pero el nivel de incorporación era bajo por lo cual se incrementó el tiempo de incubación. La Figura 8 muestra la fluorografía de la electroforesis de un lisado de trofozoítos incubados durante 5 horas con 200 uCi/ml de [³⁵S]metionina.

Se observan aproximadamente 38 polipeptidos radioactivos con pesos moleculares que van desde 20,000 a >200,000. El patrón de bandas en la fluorografía es prácticamente idéntico al que se obtiene al teñir con azul de Coomassie un gel similar, por lo que es claro que todas o casi todas las proteínas del trofozoito se marcan en las condiciones usadas.

b) Radioinmunoprecipitación

Con esta metodología, se analizaron 11 sueros de pacientes y 3 sueros de sujetos sanos. Los resultados se muestran en las Figuras 8, 9 y 10. La electroforesis de los antígenos inmunoprecipitados con los sueros de los pacientes muestran hasta 20 bandas de 200 a 24 kDa. Las bandas mas intensas precipitadas únicamente por los sueros de pacientes son de: 164, 152, 120, 42, 41, 37, 32 y 27 kDa. Cada una de estas bandas se encontró en los precipitados de mas del 70% de los sueros de pacientes (Tabla IV). Los 3 sueros de individuos sanos inmunoprecipitaron las bandas de 96, 44 y 43 kDa pero la intensidad de las señales es mucho menor que la observada en precipitados con sueros de pacientes. Las bandas de 43 y 44 kDa podrían precipitar de manera inespecifica ya que en muchos otros sistemas se encuentran bandas inespecificas en esa zona las cuales corresponden a actina. Cuando se trató el lisado de

trofozoitos solamente con proteína A-Sepharosa no se observó ninguna señal aun después de largo tiempo de exposición.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISCUSION.

En este estudio se identificaron los antígenos de trofozoito de Entamoeba histolytica cepa HM1:IMSS que reaccionan con suero inmune humano obtenido de 11 pacientes convalecientes de absceso hepático amibiano. Esta identificación se logró por medio de "Western blots" e inmunoprecipitación de antígenos marcados biosintéticamente con [³⁵S]metionina. En los experimentos iniciales, al enfrentar los sueros individualmente con antígeno total de trofozoito en un blot, se observó un patrón de reactividad muy complejo detectándose un total de 27 polipéptidos antigénicos, siendo muy prominente la reactividad con antígenos en el intervalo de 68,000 y 170,000 Da los cuales inducen anticuerpos en la mayoría de los pacientes. En contraste, aunque los sueros de individuos normales reconocieron algunos de los 27 polipéptidos, las señales en el blot fueron débiles, a excepción de la zona menor a 32,000 Da y dos polipéptidos de 37,000 y 42,000 Da. Es difícil precisar si esta reactividad en los sueros de individuos aparentemente sanos se debe a una infección previa con Entamoeba histolytica o a reactividad cruzada entre epítopes del trofozoito y otros antígenos. En México se ha estimado que entre 2.5 y 9.9% de la población posee anticuerpos anti-amiba (Gutiérrez y col., 1976). Por

otro lado es bien conocida la extraordinaria reactividad cruzada entre polisacáridos de muy diversos orígenes (Kabat, 1976). Puesto que muchos de los antígenos del trofozoito son glicoproteínas (lo cual se demuestra en esta tesis y otros trabajos en la literatura) sus porciones glicosídicas podrían cruzar con otros antígenos.

La localización de los antígenos en el trofozoito se determinó examinando la reactividad de fracciones subcelulares ricas en membranas plasmáticas, membranas internas y en componentes solubles. Estas fracciones se aislaron de acuerdo al método descrito por Aley (1980) para los trofozoitos de la cepa HK-9:NIH. Los rendimientos obtenidos en nuestras preparaciones usando la cepa HM1:IMSS fueron muy similares a los reportados en la literatura (Aley, 1980; Mathews y col., 1986). En las preparaciones de membranas plasmáticas se encontraron 21 polipéptidos con pesos moleculares entre 18,000 y 176,000 lo cual concuerda muy bien con lo descrito por Aley (1980) quien observó 18 polipéptidos en la cepa HK-9, 12 de los cuales son glicoproteínas. Sin embargo, el perfil electroforético de nuestra preparación de membranas plasmáticas mostró diferencias cuantitativas con respecto al obtenido en la cepa HK-9. El patrón electroforético de las membranas novesiculadas y debris (P III), así como el de membranas internas (P II) fue semejante al patrón electroforético de

las membranas plasmáticas (P IV). Esta similitud no es sorprendente puesto que existe un alto recambio entre la membrana plasmática y las vesículas internas (Aley, 1980). Es interesante que en la fracción soluble no se observaron cadenas polipeptídicas de peso molecular mayor a 96,000.

El análisis de la reactividad de los sueros de los pacientes con las fracciones subcelulares indica que los componentes de la membrana plasmática del trofozoito son muy importantes en su reconocimiento inmunológico. La membrana plasmática contiene prácticamente tantas especies antigénicas como se encuentran en el extracto total, siendo su perfil antigénico muy complejo. Los antígenos de la membrana plasmática reconocidos por cada uno de los 11 sueros de pacientes fueron en general los mismos, aunque se observaron diferencias individuales en la intensidad de cada banda. Es muy notable la reactividad con nueve de las bandas, las cuales además de ser muy intensas se observaron en los blots revelados con cada uno de los 11 sueros de pacientes (Tabla II). La reacción de los sueros de individuos sanos prácticamente fue insignificante en estos blots. En contraste con la complejidad antigénica observada en las membranas plasmáticas, el citosol presenta un patrón antigénico simple (compare la Figura 5 con las Figuras 3 y 4). Estos resultados son diferentes a los de Mathews y col. (1986) quienes encontraron mayor

número de antígenos en la fracción soluble que en las membranas. Sin embargo, Mathews y col. (1986) sólo analizaron dos sueros y sus resultados podrían simplemente reflejar la heterogeneidad en la respuesta inmune humoral de los pacientes.

Los antígenos amibianos capaces de inducir anticuerpos en pacientes también se investigaron por radioinmuno-precipitación. El marcaje biosintético de los polipéptidos amibianos con [^{35}S]metionina permitió eliminar de nuestros análisis la incertidumbre ocasionada por la presencia de antígenos del medio de cultivo (rico en suero bovino) en los lisados y en las membranas de los trofozoítos (González y col., 1980; García Tamayo, 1980). Además, el análisis se circunscribe a aquellos antígenos amibianos susceptibles de marcaje, i.e. exclusivamente proteínas. Por último, la metodología permite la interacción de los anticuerpos con los antígenos nativos sin que estos últimos hayan sido sometidos a procesos de desnaturalización como sucede en los Western blots, y en consecuencia, la detección de antígenos que fuesen exclusivamente reconocidos por anticuerpos contra epítopes topográficos o discontinuos (se conoce que la inmunización con antígenos nativos induce anticuerpos que no reaccionan con el mismo antígeno cuando éste está desnaturalizado). La composición antigénica de Entamoeba histolytica

observada por radioinmunoprecipitación es compleja y concuerda con la obtenida por Western blot. Un total de 20 antígenos marcados cuyos pesos moleculares van de 24,000 a 199,000 fueron inmunoprecipitados por los sueros. El 85% de los polipeptidos inmunoprecipitados aparentemente se encuentra también en los blots.

Como la membrana de los trofozoitos es rica en glicoproteínas se determinó que tan importantes son las porciones glicosídicas de éstas en el reconocimiento inmune de E. histolytica. Para este fin se oxidaron los carbohidratos de las glicoproteínas (Woodward y col., 1985) con peryodato, eliminando la capacidad de estos epitopes para reaccionar con los anticuerpos. Esta técnica de oxidación ha sido utilizada para caracterizar los epitopes de las glicoproteínas en otros parásitos, como Schistosoma y Trypanosoma cruzi (Hamburger y col., 1982; Xu y Powell, 1991). El peryodato a pH ácido oxida los grupos hidroxilo vecinos en los azúcares a dialdehído causando el rompimiento del anillo glicosídico así como de hexosas internas en oligosacáridos cuando el Carbono 3 no está sustituido (Fig 11). La oxidación suave con 10 mM de peryodato por una hora a temperatura ambiente, prácticamente no altera los epitopes del polipeptido o lípido (Woodward y col., 1985). La oxidación con peryodato es particularmente útil aplicada a Western blots ya que la

modificación de los epítopes ocurre después de la separación electroforética de las glicoproteínas, eliminando los cambios en movilidad que se presentan cuando la eliminación del carbohidrato se realiza química o enzimáticamente antes de la separación. Sin embargo, debe mencionarse que no todos los epítopes glicosídicos son sensibles al rompimiento por el peryodato, por ejemplo los determinantes compuestos de cadenas lineales con enlaces en el Carbono 3 y aquellos que contienen ácido siálico parcialmente acetilado.

La oxidación de los antígenos de la membrana plasmática de trofozoítos con peryodato resultó en la disminución de la intensidad de las bandas reconocidas por los sueros de pacientes. Esto indica que una alta proporción de los antígenos membranales identificados son glicoproteínas y que en los sueros hay poblaciones importantes de anticuerpos que reconocen sus porciones glicosídicas. La reactividad de varias de las glicoproteínas con la mayoría de los sueros persiste, aunque disminuida, después del tratamiento con peryodato; entre éstas se encuentran las de 167, 156, 96, 49 y 43 kDa. No es posible asegurar que la reactividad restante se deba a epítopes peptídicos debido a la posible presencia de determinantes antigénicos glicosídicos resistentes al peryodato en las glicoproteínas. Por otra parte la completa

pérdida de reactividad de algunos antígenos con los sueros apunta la importancia de las porciones carbohidrato en las glicoproteínas en la respuesta inmune contra el trofozoito.

En resumen, los resultados de esta tesis indican que una gran variedad de componentes de los trofozoitos son inmunogénicos en los pacientes, siendo las glicoproteínas de la membrana plasmática mas importantes que los componentes del citosol en la inducción de la respuesta humoral (Tabla V).

El análisis de la antigenicidad de los trofozoitos de Entamoeba histolytica ha sido también abordado por otros autores utilizando principalmente la metodología de western blot. Es de llamar la atención la gran variabilidad que se observa en los antígenos principalmente reconocidos por los sueros en los diferentes estudios. Estos hallazgos probablemente se deben a variaciones individuales en los pacientes. La posibilidad de la presencia de antígenos únicos en las cepas de amiba que infectan a los pacientes debe también ser considerada, aunque se conoce que existe una alta similitud entre los antígenos de aislados de zonas geográficamente diferentes (Aust Kettis y col., 1983; Mathews y col., 1986). En una de las primeras investigaciones sobre la inmunogenicidad de proteínas amibianas en pacientes, Aust Kettis y col. (1983), identificaron 7

polipeptidos de 150, 88, 82, 68, 42, 37 y 9 kDa utilizando IgG de un "pool" de sueros humanos anti-amiba. Posteriormente, Joyce y Ravdin (1988) encontraron 9 antígenos de los cuales 3 que son glicoproteínas (90, 59 y 37 kDa) son reconocidas por el 82% de los sueros de pacientes en Western blots de lisados de trofozoítos HM1:IMSS. Los antígenos de 37 y 90 kDa se localizaron en la membrana plasmática. Casi simultáneamente el mismo grupo de investigadores (Petri y col, 1987) publicó que una lectina de 170 kDa con especificidad para N-acetilgalactosamina es el antígeno predominantemente reconocido por los mismos sueros tanto en Western blots como por radioinmunoprecipitación. Por otro lado Mathews y col. (1986), encontraron antígenos solubles de 49, 90 y 110 kDa y un antígeno de 39 kDa en membranas y a diferencia con el presente estudio concluyen que el citosol contiene mas componentes antigénicos que la membrana plasmática. En contraste con el presente análisis y el de Petri y col. (1987), Bhattacharya y col. (1990) demostraron por radioinmunoprecipitación que un antígeno de 28 kDa de origen citoplásmico es el principal antígeno reconocido por sueros de pacientes con amibiasis invasora. Los resultados de estos últimos autores parecieran coincidir con los de Blakely y col. (1990) quienes identificaron una banda de 30 kDa como la mas importante en Western blots. Sin embargo,

este antígeno de 30 kDa esta en la membrana plasmática. Es interesante además que Blakely y col. (1990) no detectaron el antígeno en las cepas axénicas HM1 y HK-9 ni en aislados de pacientes asintomáticos. Es dudoso si este antígeno tiene relación con el descrito por Bhattacharya o con la banda intensa de 30 kDa que se observa en los blots de membrana plasmática de HM1 (Figura 4). Recientemente, Edman y col. (1990), reportaron que 7 antígenos de 220, 190, 160, 125-129, 96, 75 y 46 kDa son detectados por más de 62% de sueros de pacientes.

En conclusión, en esta tesis se demostró que un gran número de componentes de E. histolytica inducen respuesta inmune humoral. En un lisado total de trofozoítos se detectaron por Western blot 27 polipéptidos antigénicos con pesos moleculares de 21,000 a 167,000. Al estudiar la antigenicidad de fracciones subcelulares del trofozoíto se encontró que la membrana plasmática es muy importante en el reconocimiento del parásito por el sistema inmune del paciente, en ésta se encuentra la mayoría de las especies antigénicas del lisado total, mientras que el citosol, antigénicamente es menos complejo. Los anticuerpos de los 11 pacientes estudiados reaccionaron con prácticamente los mismos antígenos membranales siendo muy notable la reactividad con 9 bandas (167, 156, 82, 63, 49, 43, 37, 33 y 30 kDa) las cuales además de ser muy intensas se

observaron en todos los blots.

Muchos de estos antígenos membranales son glicoproteínas lo cual fue demostrado por oxidación con peryodato; las porciones glicosídicas de estas proteínas son en muchos casos inmunodominantes. El análisis y la comparación de estos resultados con los reportados en la literatura indica una gran variabilidad en la respuesta humoral anti E. histolytica de los pacientes estudiados. En general los antígenos reconocidos con mayor frecuencia por los pacientes son diferentes en cada estudio incluyendo esta tesis. Sin embargo, debe notarse que no es posible aseverar si dos bandas con idéntico peso molecular observadas en diferentes laboratorios correspondan al mismo antígeno o si bandas con pesos moleculares que difieren en unos cuantos kilodaltones son antígenos diferentes. Establecer esto con certeza requeriría una comparación directa entre los sueros y las preparaciones de antígeno de diferentes laboratorios.

Los resultados de esta tesis nos permiten profundizar en el conocimiento de la inmunogenicidad de los componentes amibianos para el hospedero. Los antígenos más inmunogénicos, de los que hemos identificado, son candidatos para ser más ampliamente caracterizados y posiblemente para aplicarse en el desarrollo de pruebas diagnósticas y de medidas inmunoprolifácticas para el control de la amibiasis.

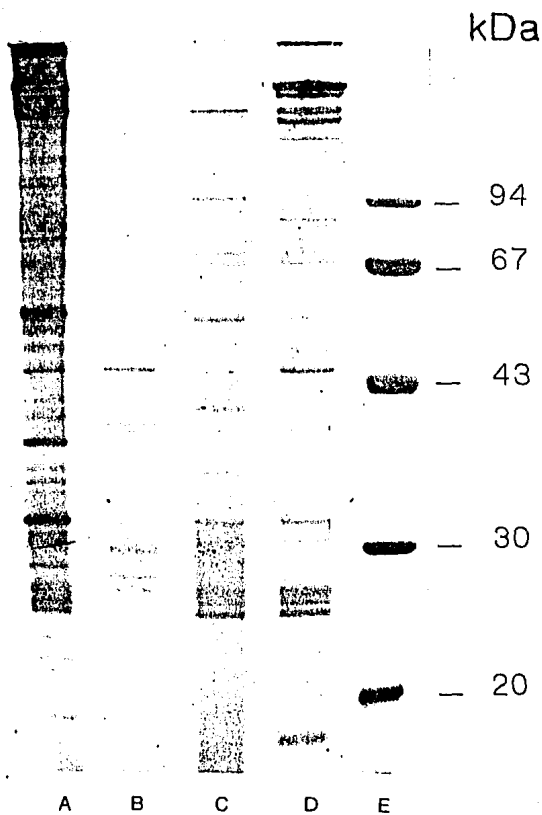


Figura 1. Análisis electroforetico en geles de poliacrilamida-SDS de las fracciones subcelulares de trofozoitos de *E. histolytica*. Carril A, membranas no vesiculadas; carril B, componentes solubles (citosol); carril C, membranas internas; carril D, membranas plasmáticas; carril E, marcadores de peso molecular. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

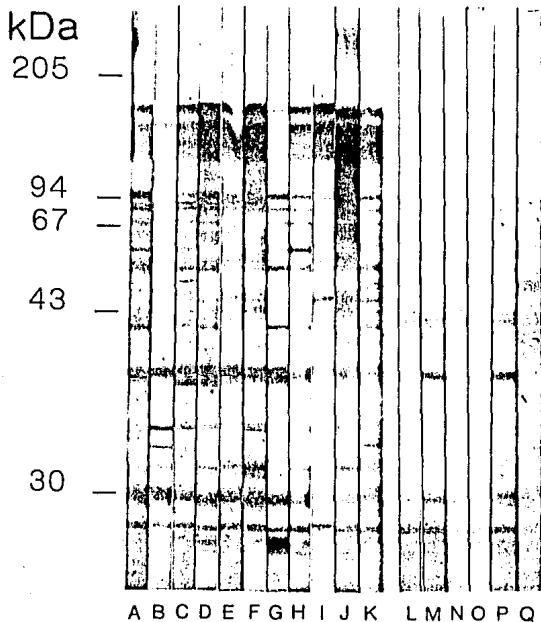


Figura 2. Inmnoelectrotransferencia de un lisado total de Entamoeba histolytica. Las tiras A a la K se trataron con los sueros inmunes de pacientes con absceso hepático amibiano y las tiras L a la Q se trataron con sueros de individuos sanos. Los anticuerpos unidos a las tiras de nitrocelulosa se detectaron con anti-inmunoglobulina conjugada con peroxidasa.

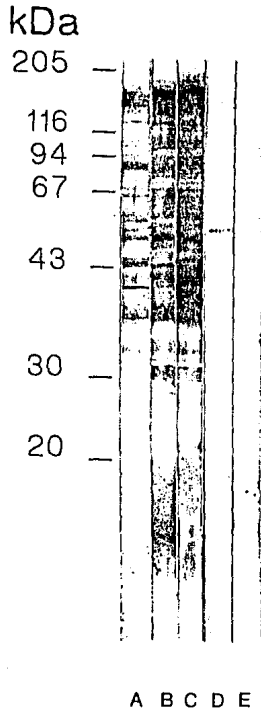


Figura 3. Inmoelectrotransferencia de antígenos de la membrana plasmática de Entamoeba histolytica. Las tiras A a la C se trataron con los sueros inmunes de pacientes con absceso hepático amibiano y las tiras D a la E se trataron con sueros de individuos sanos. Los anticuerpos unidos a las tiras de nitrocelulosa se detectaron como en la Figura 2.

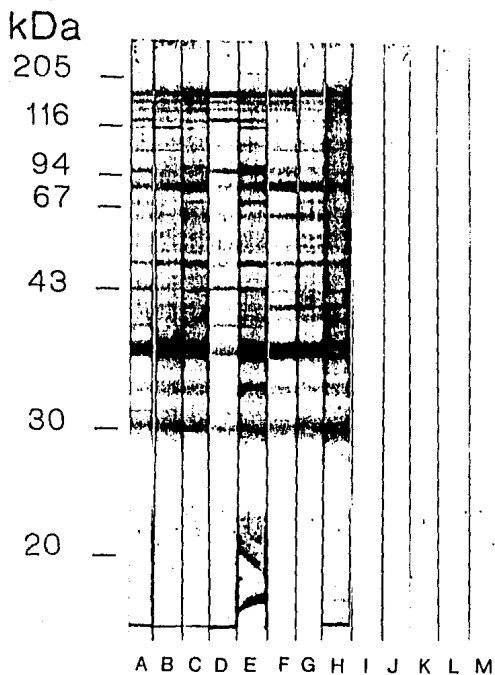


Figura 4. Inmunoelectrotransferencia de antígenos de la membrana plasmática de Entamoeba histolytica. Las tiras A a la H se trataron con los sueros inmunes de pacientes con absceso hepático amibiano y las tiras I a la L se trataron con sueros de individuos sanos. La tira M se trató solamente con el conjugado de anti-inmunoglobulina humana con peroxidasa. Los anticuerpos unidos a las tiras de nitrocelulosa se detectaron como en la Figura 2.

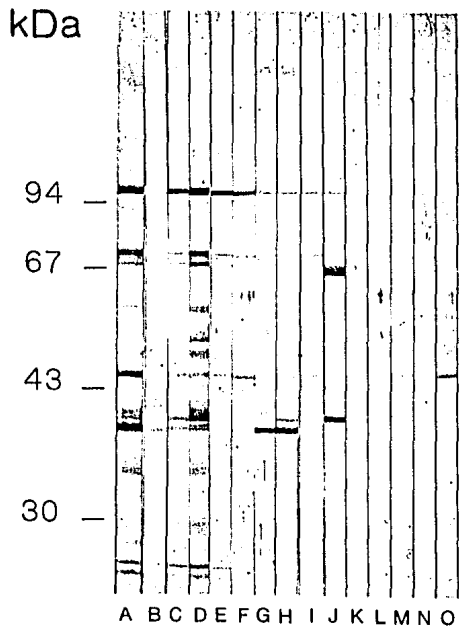


Figura 5. Inmunoelectrotransferencia de antígenos del citosol de *E. histolytica*. Las tiras A a la K se incubaron con sueros inmunes de pacientes con absceso hepático amibiano y las tiras L a la P con sueros de individuos sanos. Los anticuerpos unidos a las tiras de nitrocelulosa se detectaron como en la Figura 2.

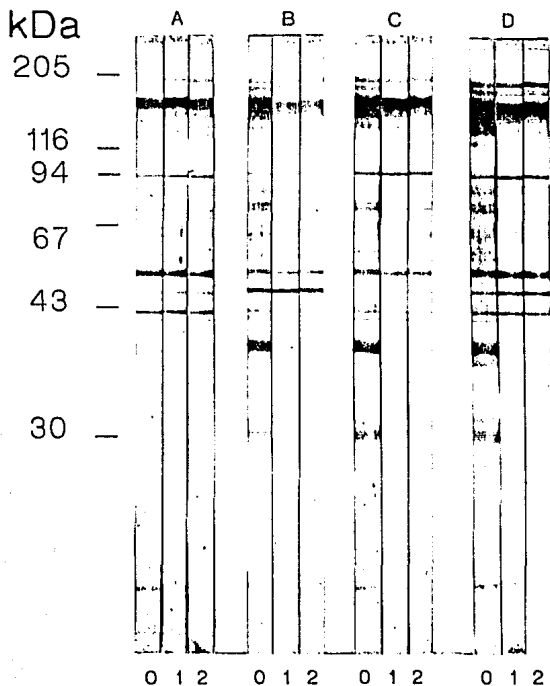


Figura 6. Efecto de la oxidación de carbohidratos por peryodato en el reconocimiento de los antígenos de la membrana plasmática de *Entamoeba histolytica*. Las tiras 0 no se trataron con peryodato (control), las tiras 1 y 2 se trataron con soluciones 10 y 20 mM de peryodato respectivamente. Los grupos de tiras A a la D se incubaron con sueros inmunes de pacientes con absceso hepático amibiano. Los anticuerpos unidos a las tiras de nitrocelulosa se detectaron como en la Figura 2.

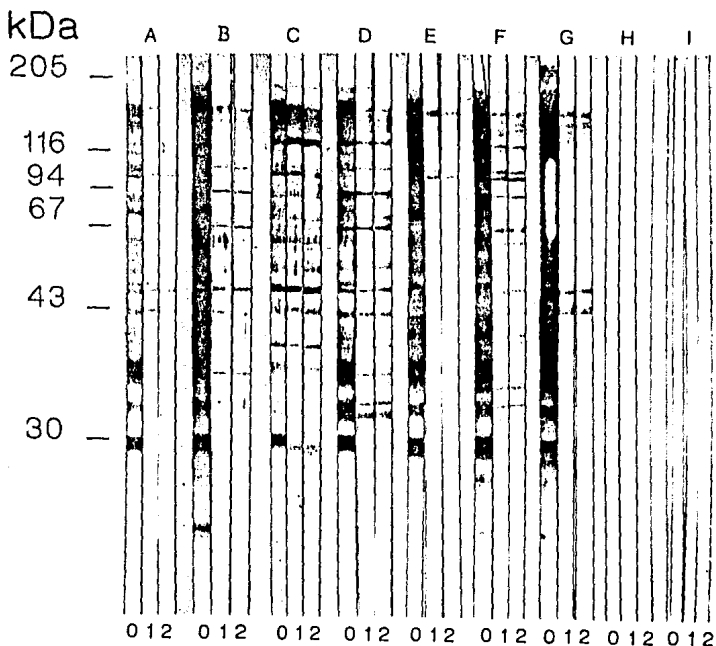


Figura 7. Efecto de la oxidación de carbohidratos por peryodato en el reconocimiento de los antígenos de la membrana plasmática de Entamoeba histolytica. Las tiras 0 no se trataron con peryodato (control), las tiras 1 y 2 se trataron con soluciones 10 y 20 mM de peryodato respectivamente. Los grupos de tiras A a la G se incubaron con sueros de pacientes con absceso hepático amibiano. El grupo H se incubó con suero de un individuo sano. El grupo I se incubó solamente con el conjugado de anti-inmunoglobulina humana con peroxidasa. Los anticuerpos unidos a las tiras de nitrocelulosa se detectaron como en la Figura 2.

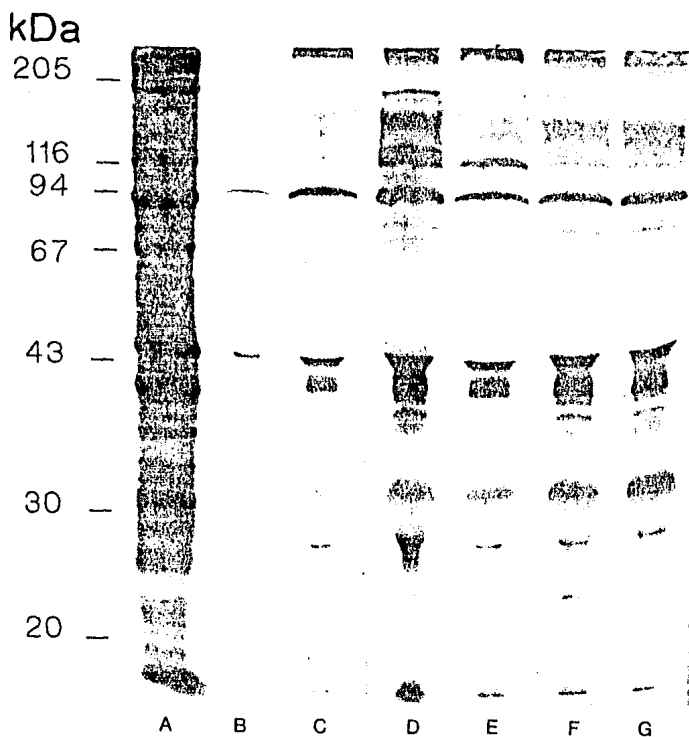


Figura 8. Inmunoprecipitación de proteínas de *Entamoeba histolytica* marcadas biosintéticamente con [^{35}S]metionina con sueros. Los complejos inmunes se aislaron con Proteína A-sepharosa. Los antígenos precipitados se separaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y se detectaron por fluorografía. Carril A, proteínas de trofozoíto marcadas con [^{35}S]metionina; Carril B, proteínas inmunoprecipitadas por suero de un individuo sano; Carril C al G, proteínas inmunoprecipitadas por sueros inmunes de pacientes con absceso hepático amibiano.

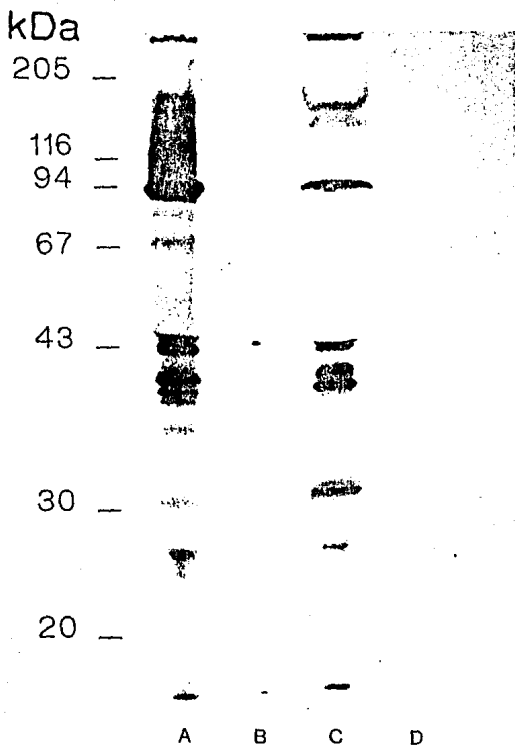


Figura 9. Inmunoprecipitación de proteínas de Entamoeba histolytica marcadas biosintéticamente con [³⁵S]metionina con sueros. Los complejos inmunes se aislaron con Proteína A-sepharosa. Los antígenos precipitados se separaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y se detectaron por fluorografía. Carril A al C, proteínas inmunoprecipitadas por sueros de pacientes con absceso hepático amibiano; Carril D, inmunoprecipitación únicamente con Proteína A-sepharosa.

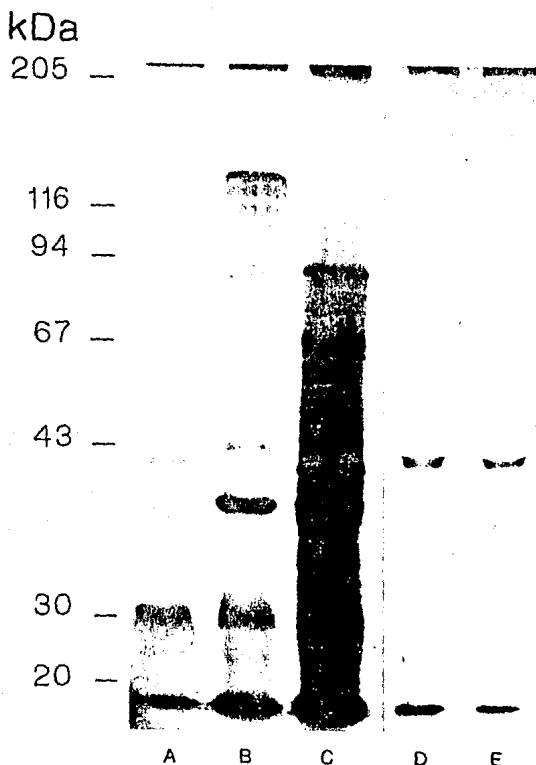


Figura 10. Inmunoprecipitación de proteínas de Entamoeba histolytica marcadas biosintéticamente con [^{35}S]metionina con sueros. Los complejos inmunes se aislaron con Proteína A-sepharosa. Los antígenos precipitados se separaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y se detectaron por fluorografía. Carril A al C, proteínas inmunoprecipitadas por sueros inmunes de pacientes con absceso hepático amibiano; Carril D y E, proteínas inmunoprecipitadas por sueros de individuos sanos.

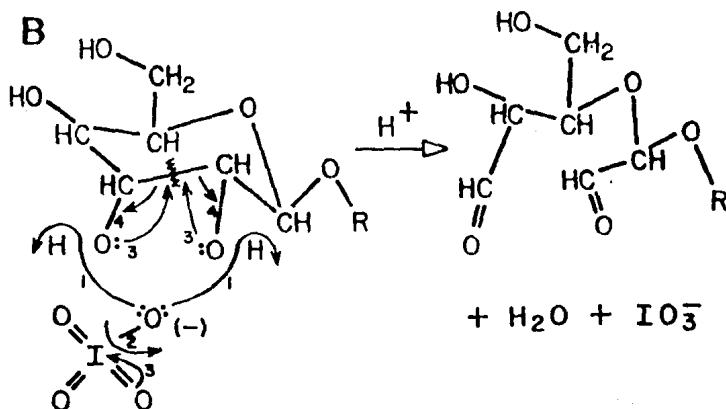
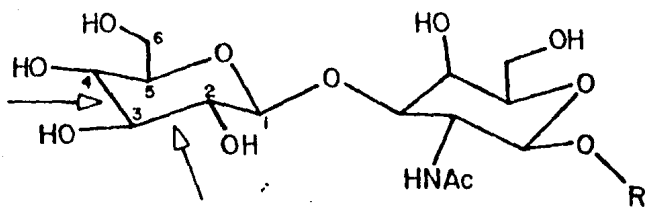


Figura 11. Reacción de oxidación de carbohidratos.
 a) Carbohidrato terminal de un oligosacárido. Las flechas indican los sitios sensibles a la oxidación con perodato.
 b) Mecanismo de reacción efectuado durante la oxidación de los grupos hidroxilo a aldehído, dando como resultado el rompimiento del anillo glicosídico.

TABLA I

RENDIMIENTO DE PROTEINAS EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES DE
TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica

Fracción	Proteína recuperada * %
Vesículas internas (P II)	9.9 ± 2.9
Membranas no vesiculadas y restos celulares (P III)	0.5 ± 0.15
Membranas plasmáticas (P IV)	1.4 ± 0.54
Componentes solubles (SN II)	88.1 ± 3.5

* Los valores representan la media de 4 experimentos ± E.E.
Los cálculos consideran un valor de 100% para el homogenado
inicial.

TABLA II

PROTEINAS DE LA MEMBRANA PLASMATICA RECONOCIDAS CON MAYOR FRECUENCIA Y MAYOR INTENSIDAD POR EL SUERO DE PACIENTES

Peso molecular (kDa)	Porcentaje de sueros que reconocen cada proteína	Intensidad
167,000	100	3
156,000	100	2 a 3
82,000	100	2 a 3
63,000	100	1 a 2
49,000	100	2 a 3
43,000	100	2
37,000	100	2 a 3
33,000	100	1 a 2
30,000	100	2 a 3

Intensidad: 1, poco intensa; 2, intensa; 3, muy intensa.

TABLA III

PROTEINAS DEL CITOSOL RECONOCIDAS CON MAYOR FRECUENCIA Y
MAYOR INTENSIDAD POR EL SUERO DE LOS PACIENTES

Peso molecular (kDa)	Porcentaje de sueros que reconocen cada proteína	Intensidad
96,000	91	2 a 3
72,000	73	2
69,000	73	1 a 2
45,000	100	1 a 2
40,000	64	2
38,000	73	2 a 3

Intensidad: 1, poco intensa; 2, intensa; 3, muy intensa.

TABLA IV

ANTIGENOS MARCADOS CON [³⁵S]METIONINA PRECIPITADOS CON
MAYOR FRECUENCIA POR EL SUERO DE PACIENTES

Peso molecular (kDa)	Porcentaje de sueros que precipitan cada proteína
164,000	73
152,000	73
120,000	82
42,000	91
41,000	82
37,000	73
32,000	91
27,000	91

TABLA V

COMPARACION DE LOS ANTIGENOS IDENTIFICADOS POR EL SUERO DE
LOS PACIENTES POR LOS METODOS DE WESTERN BLOT E
INMUNOPRECIPITACION

Método:	W.B.	Inmunoprecipitación	W.B.	W.B.
Preparación antigénica:	membrana plasmática	lisado total	lisado total	componentes solubles
		kDa		
	167 (100%)*	199 (46%)	167 (100%)	
	156 (100%)	164 (73%)	156 (100%)	
	140 (100%)	152 (73%)		
		133 (46%)	139 (73%)	
	128 (100%)	127 (36%) 120 (82%)		
	115 (82%) 108 (18%)		119 (18%)	
	104 (82%) 96 (91%) 94 (91%)	105 (18%) 96 (91%)	96 (100%)	96 (91%)
	82 (100%)		88 (82%) 82 (100%)	
		81 (55%) 72 (46%)		72 (73%) 70 (55%) 69 (73%)
	68 (73%)		68 (91%)	66 (18%)
	63 (100%) 58 (91%) 55 (100%) 53 (82%)		55 (64%)	58 (18%)
	49 (100%)			51 (36%) 49 (46%)
			48 (73%) 46 (55%) 45 (27%) 44 (73%)	45 (100%)
	43 (100%)	44 (100%) 43 (91%) 42 (91%)		
	41 (91%) 40 (100%) 39 (27%)	41 (82%) 40 (46%)	41 (64%)	41 (27%) 40 (64%) 39 (27%)
		38 (55%) 37 (73%)		38 (73%) 37 (9%)
	33 (100%)		37 (100%) 35 (64%) 34 (100%) 33 (36%) 32 (36%) 31 (91%) 30 (100%)	33 (100%)
	31 (64%) 30 (100%)	32 (91%)		
	27 (73%)	27 (91%)	27 (100%) 26 (64%)	30 (82%) 28 (9%) 27 (82%) 26 (91%)
		24 (27%)	22 (100%)	

*Los números en paréntesis representan el porcentaje de sueros de pacientes que reaccionan con el antígeno.

BIBLIOGRAFIA.

- Aley, S.B., W.A. Scott and Z.A. Cohn. Plasma membrane of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 1980; 152: 391-404.
- Aust-Kettis, A., R. Thorstensson and G. Utter. Antigenicity of Entamoeba histolytica strain NIH:200 a survey of clinically relevant antigenic components. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1983; 32(3): 512-522.
- Berzofsky, J.A. Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. Science. 1985; 229: 932-940.
- Bhattacharya, A., S. Bhattacharya, M.P. Sharma and L.S. Diamond. Metabolic labeling of Entamoeba histolytica antigens: characterization of a 28-kDa major intracellular antigen. Exp. Parasitol. 1990; 70: 255-263.
- Blakely, P., P.G. Sargeant and S.L. Reed. An immunogenic 30-kDa surface antigen of pathogenic clinical isolates of Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 1990; 162: 949-954.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72: 248-254.
- Calderón, J. and E.E. Avila. Antibody-induced caps in Entamoeba histolytica: isolation and electrophoretic analysis. J. Infect. Dis. 1986; 153(5): 927-931.
- Calderón, J., M.L. Muñoz y H.M. Acosta. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in Entamoebae. J. Exp. Med. 1980; 151: 184-193.
- Diamond, L.S., D.R. Harlow and C.C. Cunnick. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1978; 72: 431-432.
- De León, A. Pronóstico tardío en el absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Med. (México). 1970; 1(supl. 1): 205-206
- Del Muro, R., E. Acosta, E. Merino, W. Glender y L. Ortiz Ortiz. Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection. J. Infect. Dis. 1990; 162: 1360-1364.

Del Muro, R., A. Oliva, P. Herion, R. Capin y L. Ortiz Ortiz. Diagnosis of Entamoeba histolytica in feces by ELISA. J. Clin. Lab. Anal. 1987; 1: 322-325.

García Tamayo, F., B. Hashimoto Yañez y J. Kumate. Proteínas propias y del medio de cultivo en los trofozoitos de Entamoeba histolytica obtenidos axénicamente. Arch. Invest. Méd.(Méx). 1980; 11(supl.1): 159.

González, O.N., L.G. Warren y R. Gohd. Serum proteins in the plasma membrane of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx). 1980; 11 (supl.1): 109.

Gutiérrez, G., Ludlow, A., Espinosa, G., Herrera, S., Muñoz, O., Rattoni, N. y Sepúlveda, B. Encuesta serológica nacional. II. Investigación de anticuerpos contra Entamoeba histolytica en la República Mexicana. Proc.Int.Conf. Amebiasis, Sepúlveda, B. y Diamond, L.S., Eds., IMSS., México D.F., 1976.

Hamburger, J., S. Lustigman, T.K. Arap Siogok, J.H. Ouma y A.A.F. Mahmoud. Characterization of a purified glycoproteins from Schistosoma mansoni eggs, specificity, stability, and the involvement of carbohydrate and peptide moieties in its serologic activity. J. Immunol. 1982; 128(4): 1864-1869.

Harries, J. Amoebiasis: a review. J. R. Soc. Med. 1982; 75: 190-197.

Healy, G.R. Serology. En J.I. Ravdin (compilador) Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica. John Wiley & Sons, New York, 1988; p. 650-663.

Joyce, M.P. and J.I. Ravdin. Antigens of Entamoeba histolytica recognized by immune sera from liver abscess patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1988; 37(1): 74-80.

Juniper, K., C.L. Worrel, M.C. Minshew, L.S. Roth, H. Cypert y R.E. Lloyd. Serological diagnosis of amebiasis. Am J. Trop. Med. Hyg. 1972; 21: 157-167.

Kabat, E.A. Structural concepts in immunology and immunochemistry. Holt, Rinehart y Winston, Inc., New York, 1976.

Kretschmer, R.R. y M. López Osuna. Effector mechanisms and immunity to amebas. En R.R. Kretschmer (compilador) Amebiasis: infection and disease by Entamoeba histolytica. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1990; p. 117.

Krupp, I. M. y S. J. Powell. Antibody response to invasive amebiasis in Durban, South Africa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1971; 20: 414.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. 1970; 227: 680-685.

Laskey, R.A. The use of intensifying screens or organic scintillators for visualizing radioactive molecules resolved by gel electrophoresis. Methods Enzymol. 1980; 65: 363-371.

Lushbaugh, W.B. y J.H. Miller. The morphology of Entamoeba histolytica. En J.I. Ravdin (compilador) Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica. John Wiley & Sons, New York, 1988; p. 41-68.

Martínez Palomo, A. The biology of Entamoeba histolytica. John Wiley & Sons, New York, 1982; p. 32-39.

Martínez Palomo, A. y M. Martínez Baez. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. X.Amebiasis. Rev. Infect. Dis. 1983; 5: 1093-1102.

Mathews, H.M., D.M. Moss and G.S. Visvesvara. Analysis of antigens from membrane and soluble fractions of Entamoeba histolytica. J. Protozool. 1986; 33(3): 328-334.

Merino, E., W. Glender, R. del Muro y L. Ortiz Ortiz. Evaluation of the ELISA test for detection of Entamoeba histolytica in feces. J. Clin. Lab. Anal. 1990; 4: 39-42.

Mitchell, G.F. Towards molecular vaccines against parasites. Parasit. Immunol. 1984; 6: 493-498.

Muñoz, M.L., E. Lamoyi, G. León, R. Tovar, J. Pérez García, M. De la Torre, E. Murueta y R.M. Bernal. Antigens in electron-dense granules from Entamoeba histolytica as possible markers for pathogenicity. J. Clin. Microbiol. 1990; 28(11): 2418-2424.

Norman, L., D. Gold e I.G. Kagan. The serologic response of hamsters to experimental liver inoculations with Entamoeba histolytica as measured by indirect hemagglutination test and enzyme linked immunosorbent assay. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1979; 28: 198-205.

Ortiz Ortiz, L., B. Ruiz y A. Gonzalez. Cellular immune responses. En R.R. Kretschmer (compilador) Amebiasis: infection and disease by Entamoeba histolytica. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1990; p. 77-90.

Patterson M., G.R. Healy y J.M. Shabot. Serologic testing for amoebiasis. Gastroenterology 1980; 78: 136-141.

Petri, W.A.Jr., P. Joyce, J. Broman, R.D. Smith, C.F. Murphy and J.I. Ravdin. Recognition of the galactose- or N-acetylgalactosamine-binding lectin of Entamoeba histolytica by human immune sera. Infect. Immun. 1987; 55(10): 2327-2331.

Petri, W.A.Jr., J.I. Ravdin. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of Entamoeba histolytica. Infect. Immun. 1991; 59(1): 97-101.

Ravdin, J.I. y R.L. Guerrant. A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amoebiasis. Rev. Infect. Dis. 1982; 4: 1185-1207.

Salata, R.A. y J.I. Ravdin. Human cell-mediated immune mechanisms directed against Entamoeba histolytica. En J.I. Ravdin (compilador) Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica. John Wiley & Sons, New York, 1988; p. 471-479.

Schulz, T.F., H. Kollaritsch, P. Hengster, H. Stemberger, O. Scheiner, G. Wiedemann, M.P. Dierich. Molecular weight analysis of Entamoeba histolytica antigens recognized by IgG and IgM antibodies in the sera of patients with amoebiasis. Trop. Med. Parasitol. 1987; 38(3): 149-152.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1979; 76: 4350-4354.

Ungar, B.L.P., R.H. Yolken y T.C. Quinn. Use of a monoclonal antibody in an enzyme immunoassay for the detection of Entamoeba histolytica in fecal specimens. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1985; 34: 465-472.

Walsh, J.A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 1986; 8: 228.

WHO Expert Committee Report. Amoebiasis. WHO Tech. Rep. Ser. 1969; 421: 5-52.

Woodward, M.P., W.W. Young, Jr. and R.A. Bloodgood. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. J. Immun. Meth. 1985; 78: 143-153.

Xu, B. y M.R. Powell. Carbohydrate epitopes are responsible for antibody cross-reactivity in Trypanosoma cruzi-infected mice. J. Parasitol. 1991; 77(5): 808-810.