

Nº 118
ZEL



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD PROTECTORA DE
UNA GLUCOPROTEINA DE Entamoeba histolytica.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JOSE MIGUEL PEÑA YOMOGUITA

MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E .

	Pags.
1.- RESUMEN.	1
2.- INTRODUCCION.	2
3.- GENERALIDADES.	4
3.1.- Historia.	4
3.2.- <u>Entamoeba histolytica</u> .	6
3.3.- Definición de amibiasis.	6
3.4.- Etiología.	6
3.5.- Patogenia.	8
3.6.- Diferenciación entre amibas patógenas y no patógenas.	9
3.7.- Mecanismos inmunes contra la amiba.	11
3.8.- Inmunidad celular.	14
3.9.- Antígenos amibianos.	15
4.- OBJETIVOS.	20
4.1.- Objetivo general.	20
4.2.- Objetivos particulares.	
5.- Materiales y Métodos.	21
5.1.- Obtención del antígeno.	21
5.1.1.- Cultivo de trofozoítos de <u>E. histolytica</u> .	21
5.1.2.- Obtención de la fracción glucoproteica.	21
5.1.3.- Determinación de proteínas.	22
5.2.- Caracterización inmunológica del antígeno.	22

5.2.1.- Doble inmunodifusión radial.	22
5.3.- Obtención del conjugado.	22
5.4.- Ensayo inmunoenzimático en fase sólida.	24
5.4.1.- Titulación del conjugado por ELISA.	24
5.4.2.- Estandarización de la prueba de ELISA.	25
5.4.3.- Titulación de anticuerpos anti-gluco - proteína.	25
5.5.- Formación de abscesos hepáticos amibianos.	26
5.5.1.- Animal de experimentación.	26
5.5.2.- Método intrahepático para producir abscesos hepáticos amibianos.	26
5.5.3.- Estandarización de la dosis infectante.	27
5.5.4.- Sacrificio de los animales.	27
5.6.- Inmunización de gerbilos con la fracción glucoproteica.	27
5.6.1.- Esquema de inmunización con adyuvante.	27
5.7.- Obtención del suero.	28
5.7.1.- Punción por plexo retro orbital.	28
5.7.2.- Punción cardíaca.	28
5.8.- Ensayo de activación <i>in vitro</i> .	29
5.8.1.- Obtención de células de bazo.	29
5.8.2.- Ensayo de activación con mitógenos.	29
5.8.3.- Ensayo de activación antígeno específico.	30
5.9.- Estudio histopatológico del hígado.	30
5.9.1.- Estudio histológico	30
6.- RESULTADOS.	32
6.1.- Doble inmunodifusión radial.	32

6.2.- Titulación del conjugado por ELISA.	32
6.3.- Estandarización de la prueba de ELISA.	37
6.4.- Titulación de anticuerpos anti-gluco - proteína.	37
6.5.- Estandarización de la dosis infectante.	37
6.6.- Evaluación de la protección.	48
6.7.- Ensayo de activación con mitógenos.	48
6.8.- Ensayo de activación antígeno específico.	48
6.9.- Estudio histológico.	49
7.- DISCUSION.	56
8.- CONCLUSIONES.	62
9.- BIBLIOGRAFIA.	64

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

ACF	Adyuvante completo de Freud
AcM	Anticuerpos monoclonales.
AHA	Absceso hepático amibiano.
Con A	Concanavalina A.
DIR	Doble inmunodifusión radial.
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida.
FG	Fracción glucoproteica.
γ	Gammas globulinas.
GP	Glucoproteína.
I ¹²⁵	Iodo radioactivo.
LPFG	Lipopeptidofosfoglicana.
MP	Membrana plasmática.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
SC	Suero de conejo.
SFB	Suero fetal Bovino.
SNC	Suero normal de cabra.
SBI	Solución salina isotónica.

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1: Fracciones celulares de Entamoeba histolytica.

Tabla 2: Contenido de azúcares y proteínas de Entamoeba histolytica.

Tabla 3: Títulos de anticuerpos anti-GP de gerbilo unida a peroxidasa.

Tabla 4: Estandarización de ELISA para determinar los títulos de anticuerpos anti-GP en sueros de gerbilos.

Tabla 5: Evaluación de la respuesta humoral en sueros de gerbilos inmunes.

Tabla 6: Estandarización de la dosis infectante.

Tabla 7: Evaluación de la protección.

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1: DIR de la FG.

Figura 2: DIR de las \mathcal{T} de gerbilo.

Figura 3: Titulación del conjugado \mathcal{T} de conejo anti- \mathcal{T} de gerbilo unida a peroxidasa por ELISA.

Figura 4: Estandarización por ELISA de anticuerpos anti-GP en sueros de gerbilos.

Figura 5: Respuesta de anticuerpos anti-GP en sueros de gerbilos.

Figura 6: Estandarización de la dosis infectante.

Figura 7: Fotografías de formación AHA.

Figura 8: Gráfica de evaluación de protección.

Figura 9: Ensayo de activación Con A.

Figura 10: Ensayo de activación antígeno específico.

Figura 11: Estudio histológico

1.- RESUMEN.

Para estudiar la participación del sistema inmune en la amibiasis es necesario definir cuales antígenos de Entamoeba histolytica son reconocidos durante la infección.

En este trabajo se decidió evaluar la capacidad de la fracción glucoproteica (FG) extraída de E. histolytica cultivada en medio axénico, para conferir protección contra la infección amibiana.

La respuesta humoral se determinó mediante una prueba inmunoenzimática en fase sólida (ELISA); la respuesta celular utilizando la técnica de transformación blastoide, y la protección mediante la observación macroscópica y microscópica del hígado.

Los resultados obtenidos fueron que al inmunizar a los gerbilos (días 0, 7 con 100 $\mu\text{g/ml}$ de FG), con posterior reto el día 23 con 2.5×10^6 de trofozoítos de E. histolytica cepa HM1:IMSS intrahepáticamente, no se logro obtener activación de la respuesta inmune celular, así mismo, la respuesta inmune humoral fue baja, por lo cuál se concluye que la GP de aproximadamente 30-35 Kd no confirió protección.

2.- INTRODUCCION

Dentro de las enfermedades que se presentan en todo el mundo, la amibiasis es una de las más importantes, hay estudios que reportan un 10% de ataque a la población mundial (1), esta cifra puede elevarse sobre todo en países en vías de desarrollo, entre los que se encuentra México. La problemática abarca a los dos grupos poblacionales: el rural, donde existe una gran carencia de servicios tales como: drenaje, agua potable, etc; y el medio urbano, donde si bien es cierto existen ese tipo de servicios, éstos son desequilibrados; aunado a ello, la migración masiva a las grandes urbes, permite que se presente hacinamiento, fecalismo al aire libre, proliferación de establecimientos de comida en las vías públicas, etc. Por todo lo anterior, el problema de la amibiasis en países como México está muy lejos de solucionarse.

Sin duda, la mayor repercusión de esta enfermedad es a nivel gastrointestinal, donde un individuo puede llegar a presentar varios cuadros clínicos durante el curso de su vida, pero la principal complicación de la amibiasis se presenta cuando Entamoeba histolytica rebasa la membrana intestinal y se instala en hígado, ocasionando la formación del absceso hepático amibiano (AHA), que puede ocasionar la muerte del individuo.

En las últimas dos décadas, se han desarrollado numerosos estudios para el aislamiento y caracterización de antígenos de Entamoeba histolytica, que juegan un papel importante en la

relación huésped parásito. Estos se han concentrado en aquellos antígenos que se localizan en la superficie, por la relevancia que pueden tener por ser aquellos que son primeramente reconocidos por el hospedero y por ende ser útiles tanto en el desarrollo de métodos eficaces para el diagnóstico de la enfermedad, así como para el empleo en la elaboración de una posible vacuna.

3.-GENERALIDADES DE Entamoeba histolytica.

3.1.- Historia.

La existencia de la amibiasis podemos situarla, desde la aparición del hombre en la tierra. Sin embargo, no es sino hasta el siglo XIX cuando empieza a estudiarse el parásito causante de esta enfermedad.

Fedor Lösh, médico ruso publicó la primera descripción de un caso de disentería amibiana recurrente en 1875. Este estudio abarcó el análisis del contenido de la materia fecal del paciente y el material de autopsia, así como la descripción de la amiba incluyendo su estructura, tamaño, movilidad, núcleos, vacuolas y elementos intracitoplásmicos tales como células rojas. Además, llevó a cabo experimentos en los que administró la materia fecal del paciente a cuatro perros. Lösh llamó a la amiba Amoeba coli, y concluyó que la disentería no era debido a este organismo, pues el curso de la enfermedad fue diferente para su paciente y los animales de experimentación.

En 1881, Koch observó la presencia de amibas en cortes histológicos provenientes de pacientes con disentería y complicaciones de absceso hepático, y pensó que esto pudiese tener algún papel en la patogénia de la enfermedad.

Councilman y Lafleur, reconocieron la amibiasis como entidad clínica, causado por un agente específico que llamaron Amoeba

dysenteriae e introdujeron los términos de "disentería amibiana" y de "absceso hepático amibiano".

En 1893, Quinck y Roos demostraron los quistes de la amiba y observaron que estas formas vegetativas eran capaces de producir disentería en animales de experimentación, y notaron la gran resistencia de los quistes en comparación con la fragilidad de los trofozoítos, lo que abrió el camino a la elucidación del modo de transmisión de la disentería amibiana.

En 1903, Huber detalló el número de núcleos de los quistes de la amiba. Este mismo año Schaudinn, brillante protozoólogo asigna los términos de Entamoeba histolytica, para especie patógena, debido a su capacidad de destruir los tejidos; y Entamoeba coli para la especie no patógena, la cual es un comensal inocuo del intestino grueso.

En 1913, Walker y Sellars en voluntarios de la prisión de Manila, demostraron que E. histolytica no siempre era capaz de producir sintomatología y confirmaron que también el hombre podía ser infectado por los quistes.

A lo largo de todos estos años fueron desarrollados numerosos medios de cultivo para el crecimiento *in vitro* de Entamoeba histolytica entre los que podemos mencionar el de Musgrave y Clegg (1904), el de Boeck y Drbohlav, llamado "Loecke's egg-serum" (1925), el de Shafer y colaboradores (1948) y el de Pan (1960). Finalmente Diamond en 1961, elaboró un cultivo libre

de otros asociados, el cual ha facilitado las investigaciones bioquímicas e inmunológicas de este protozoario. (4,5,6,7,8).

3.2.- Entamoeba histolytica.

Pertenece al Phylum Protozoa (es un organismo unicelular), subphylum Sarcodina (se mueve por pseudópodos y tiene una reproducción asexual por fisión binaria), clase Rhizopoda (se enquista y habita el canal intestinal) y al género Entamoeba (el trofozoito tiene un núcleo con un pequeño cariosoma central y una membrana nuclear con gránulos de cromatina adyacente), (8).

3.3.- Definición de amibiasis.

Se denomina amibiasis al estado resultante de albergar Entamoeba histolytica, con o sin manifestaciones clínicas (1).

La amibiasis es una enfermedad cosmopolita, su incidencia se estima que afecta a un 10% de la población mundial, y puede diferir de una región a otra (1,9).

3.4.- Etiología.

El trofozoito de Entamoeba histolytica (forma vegetativa), se aloja en el intestino, reproduciéndose por fisión binaria. Bajo condiciones desfavorables, los trofozoitos se diferencian en quistes (forma infectiva), y se elimina por la materia fecal. La transmisión de un hospedero a otro se realiza por vía oral,

al ingerir los quistes en vehículos tales como agua y alimentos contaminados.

Trofozoíto: es una fase altamente dinámica y pleomórfica, con movimientos característicos mediante la emisión de pseudópodos rápidos, digitiformes, largos y anchos. Su tamaño en cultivo *in vitro* varía de 15 a 30 μm , dependiendo de las condiciones del medio. La membrana plasmática (MP) es similar a la de otras células eucarióticas, con una cubierta celular apenas detectable. El citoplasma contiene diferentes organelos: cuerpos densos, ribosomas, polisomas, gránulos osmiófilos, cuerpos helicoidales, cuerpos tubulares, vacuolas alimenticias y vesículas, las membranas de estos organelos poseen la misma estructura que la MP; presenta también lisosomas activos especializados de superficie. La amiba carece de mitocondria y aparato de Golgi, y su retículo endoplásmico consiste de vesículas finas rodeadas de algunos ribosomas. El núcleo es ovalado, con un nucleolo central y cromatina periférica. La envoltura nuclear presenta gran cantidad de poros.

Prequiste: cuando las condiciones del medio ambiente en las que se encuentra el trofozoíto son desfavorables para su vida, éste empieza a inmovilizarse, se desprende de los alimentos no digeridos, se reviste de una doble membrana refringente que le confiere resistencia, formándose así el prequiste. Presenta un solo núcleo, además puede contener una masa de glucógeno y barras cromatoidales.

Quieste: conforme transcurre el tiempo, en el interior del prequiste hay actividad metabólica, por dos mitosis consecutivas de un núcleo se originan 4, quedando al final del proceso el quiste maduro. Este presenta una formación esférica u oval, con un diámetro de 8 a 20 μm , y una pared de 125 a 150 nm de grosor. Su MP frecuentemente presenta profundas invaginaciones y en su citoplasma se observan polirribosomas, vacuolas y depósitos de glucógeno.

Metaquiste: en un medio neutro o ligeramente alcalino (y combinado con la acción de los jugos digestivos), se debilita la pared del quiste, y permite que la amiba multinucleada se escurra hacia el exterior por una pequeña hendidura de la pared que lo envuelve, liberándose así el metaquiste (10).

3.5.- Patogenia.

Entre los factores patogénos de la amibiasis se pueden enumerar:

- a) Colonización del intestino por una cepa ambiana virulenta.
- b) Contacto íntimo por adherencia a la mucosa intestinal.
- c) Destrucción de las barreras intestinales por enzimas o productos tóxicos.
- d) Lisís de las células intestinales y de las células inflamatorias del huésped, lo cual lleva a la destrucción de la mucosa intestinal, úlceras del colon, y a una posterior invasión de tejidos más profundos y/o invasión de órganos distantes,

principalmente el hígado (11).

Clinicamente la amibiasis puede ser: Asintomática o Sintomática (1).

La Sintomática puede ser:

A) Amibiasis Intestinal:

- a.- Disentería: disentería amibiana aguda.
- b.- Colitis no disentérica: disentería amibiana crónica.
- c.- Ameboma: una forma localizada de amibiasis intestinal.
- d.- Apendicitis amibiana.

B) Amibiasis extraintestinal:

- e.- Hepática: la forma mas común de amibiasis extraintestinal.
- f.- Cutánea.
- g.- En otros órganos como: pulmones, bazo, cerebro, etc.

La asintomática es detectada de una forma accidental, ya que los pacientes ingresan por otras causas de enfermedad y en ellos son aislados quistes de E. histolytica.

3.6.- Diferenciación entre amibas patógenas y no patógenas.

En análisis microscópico de heces, de pacientes con amibiasis intestinales e individuos sanos, se encuentran

frecuentemente quistes de E. histolytica: este hallazgo hizo pensar en la existencia de dos cepas amebianas: una patógena y otra no patógena, sin embargo, por la observación de las diferencias morfológicas de los quistes, no fue posible confirmar esa hipótesis, ya que los quistes provenientes tanto de individuos sanos como enfermos, presentaban las mismas características.

En 1968, Robinson (12) describió un método de cultivo monoxénico de amibas, que permitió transformar los quistes de Entamoeba histolytica en trofozoítos, este método fue posible obtener grandes cantidades de trofozoítos. Este hecho permitió que Sargeant y Williams (13), empleando el comportamiento electroforético de 4 isoenzimas de la amiba, encontrasen que la marca de patogenicidad está dada por el corrimiento electroforético en beta de la isoenzima fosfoglucomutasa y rápida en hexoquinasa. Además de separar amibas patógenas de no patógenas, (Sargeant y cols.) clasificaron en forma general a los trofozoítos, por lo que fue necesario emplear el término de zimodemo.

En la actualidad, la técnica de zimodemo es la única capaz de distinguir amibas patógenas de no patógenas, sin embargo, debido a su elevado costo no es posible aplicarla en laboratorios de rutina.

3.7.- Mecanismos inmunes contra la amiba.

Los mecanismos inmunes humanos en contra del parásito, aún no han sido totalmente establecidos.

En la mayoría de los individuos infectados, Entamoeba histolytica habita como un comensal, por lo que las condiciones que llevan al desarrollo de la enfermedad invasiva son multifactoriales y están relacionados con el balance entre los mecanismos patógenos del parásito y los mecanismos de defensa del huésped, ya sean estos inmunes o no.

En el humano, E. histolytica es capaz de inducir una respuesta inmune tanto humoral como celular, sin embargo, aún no se ha establecido cuál de estos mecanismos inmunes es el responsable de limitar la invasión amibiana o de inducir inmunidad en contra de la enfermedad invasiva recurrente (14).

La respuesta inmune humoral (15,16) se desarrolla con la enfermedad invasiva, así lo demuestran estudios seroepidemiológicos, en donde del 81 al 100% de los pacientes con amibiasis intestinal o con AHA desarrollan anticuerpos circulantes IgG específicos contra E. histolytica. Otros estudios demostraron la presencia de coproanticuerpos de la clase IgA en pacientes con amibiasis intestinal (17).

Una respuesta serológica positiva sólo es indicativa de la invasión por el parásito, ya sea presente o pasada, aunque

regularmente (18,19), los títulos más altos se presentan con el desarrollo reciente de la enfermedad invasiva, y la presencia de tales anticuerpos puede persistir de 9 hasta 11 años (15,18); no hay evidencias que indiquen que el título de los anticuerpos correlacionen con el estado clínico del paciente.

También se ha informado que la protección conferida por la inmunización de hamsters con diferentes preparaciones de antígenos amibianos no correlacionaba con la respuesta de anticuerpos séricos (20).

Según estudios realizados tanto con sueros obtenidos de individuos sanos como con sueros de pacientes con amibiasis (con títulos altos de anticuerpos anti-E. histolytica) se observó en los sueros de pacientes una actividad amebicida hacia los trofozoítos a través de la activación de la vía clásica o bien de la vía alterna del complemento (21,22,23).

En los fluidos del AHA se reportó la presencia de complemento con títulos más bajos, que los encontrados en el suero, así mismo se encuentran presentes antígenos amibianos y anticuerpos; hallazgo que apoya la idea de que "localmente" pueden formarse complejos inmunes fijadores de complemento (24,25).

La presencia de complejos inmunes conjuntamente con neutrófilos infiltrados pudiesen contribuir al proceso necrótico y a la patogénia de la enfermedad (26).

En suma la respuesta inmune humoral contra E. histolytica no parece ser responsable de limitar el desarrollo de una infección ya establecida o de conferir resistencia hacia la amibiasis invasiva, pero los mecanismos humorales son directamente responsables de la inmunidad a cepas sensibles a complemento e indirectamente causantes del reclutamiento de células inflamatorias.

Neutrófilos polimorfonucleares.- Desde los primeros estudios (27) se describió que los neutrófilos luego de sufrir marcados cambios morfológicos eran fagocitados *in vitro* por trofozoitos de E. histolytica; posteriormente se demostró (28), que las cepas virulentas de E. histolytica eran capaces de matar neutrófilos humanos a través de un mecanismo contacto-dependiente, mientras que los neutrófilos eran capaces de matar solo amibas axénicas de poca virulencia por medio de un proceso extracelular contacto dependiente que actuaba aún en presencia de anticuerpos anti-amiba.

En estudios recientes (29,30), se encontró que amibas axénicas virulentas de la cepa HMI:IMSS podían matar neutrófilos humanos sin perder su viabilidad, mientras que los neutrófilos, solo eran capaces de matar cepas poco virulentas (200:NIH y 300:NIH).

3.8.- Inmunidad celular.

Modelos *in vivo*.-

Tanto los estudios clínicos como los experimentales han puesto de manifiesto la importancia que revisten los mecanismos inmunes celulares en la amibiasis.

En los estudios donde se utilizó al hamster como modelo experimental se demostró que al deprimir la inmunidad tanto humoral como celular mediante tratamiento con: esteroides, timectomía neonatal, esplenectomía, radiación, sílica, globulina antimacrófago o antilinfocítica, se facilitaba la formación de AHA (31,32,33,34,35). En otros modelos se observó cierto grado de protección cuando previo a la administración del antígeno se inmunizaba con el bacilo de Calmette Guérin o cuando había existido una infección previa con Trichinella spirallis (36).

Actividad mitogénica de preparaciones de proteínas solubles amibianas:

Se han efectuado numerosos estudios que intentan examinar las vías aferentes de la inmunidad celular hacia Entamoeba histolytica. En experimentos *in vitro* varios autores (37,38,39,) encontraron que proteínas solubles provenientes de amibas cultivadas en medio axénico no inducían la transformación blastoide de los linfocitos provenientes de individuos sanos. Sin embargo, y en contraste con estos trabajos, recientes se ha demostrado (40,41,42) que las proteínas solubles eran capaces de

inducir la proliferación de linfocitos T en individuos sanos, no así de los linfocitos B, esta respuesta proliferativa fue diferente a la respuesta hacia Concanavalina A (Con A) en cuanto a su magnitud, concentración óptima y cinética.

3.9.- Antígenos amibianos.

Para estudiar la participación del sistema inmune en la amibiasis es necesario definir y caracterizar los antígenos que son reconocidos durante la infección. El cultivo de E. histolytica en medio axénico (43) sentó las bases para separar los antígenos amibianos y estudiar sus características inmunológicas.

- Estudio de los antígenos de superficie del trofozoíto.

Los antígenos de superficie de trofozoítos de Entamoeba histolytica deben ser los primeros en ser reconocidos por el sistema inmune del huésped durante la infección, además de inducir los mecanismos efectores letales para el parásito.

La existencia e importancia de estos antígenos ha sido demostrada con pruebas como: inmovilización del trofozoíto por suero inmune (44,45,46), unión del suero inmune fluoresceinado a trofozoítos intactos (47,48,49), y la lisis de trofozoítos mediada por anticuerpos y complemento (21,22,23).

Los antígenos amibianos más empleados hasta la fecha han sido, células completas y sus homogenizados, así como fracciones solubles o particuladas obtenidas a partir de trofozoítos. La mayoría de los estudios efectuados están relacionados con antígenos capaces de inducir la respuesta inmune humoral y muy pocos estudios están relacionados con antígenos capaces de producir respuesta inmune celular.

A partir de la última década se iniciaron los estudios acerca de la naturaleza de estos antígenos, y se han aislado varias proteínas de las fracciones de membrana de Entamoeba histolytica (50,51,52).

En 1980 Aley y col. empleando trofozoítos de Entamoeba histolytica cultivados axénicamente desarrollaron una metodología para el aislamiento de MP, basado en su unión específica con Con A, que estabiliza la membrana, evita su fragmentación y facilita su separación (53). Se obtuvieron estructuras del parásito y de las fracciones celulares aisladas se determinaron sus propiedades químicas y enzimáticas identificándose cuando menos 12 componentes glucoprotéicos de MP.

Posteriormente, y con la misma técnica y marcaje con Iodo radioactivo (I^{125}) comprobaron que MP se interioriza en forma de vesículas endocíticas lo que indica el intenso reciclaje de la membrana que experimenta el parásito por endocitosis (54).

En estudios previos se reportó el % promedio de proteínas de cada fracción amibiana, separada por el método de Aley así como el porcentaje de peso seco de las mismas (tabla 1), así mismo el contenido de azúcar en las mismas fracciones (tabla 2) (55).

TABLA 1:

Porcentaje de las fracciones celulares de E. histolytica obtenidas por el método de Aley.

150 X 10⁶ Amibas.

	% Proteínas	% Peso seco
Componentes solubles	61.0	62
Membranas internas	14.7	28
Membranas no vesiculadas	16.8	7.2
Membranas plasmáticas	2.6	2.4

TABLA 2:

Contenido de azúcares y proteínas de E. histolytica.

60 X 10 ⁶ Amibas	mg. azúcares	mg. proteínas
Componentes solubles	2.51	41.72
Membranas internas	2.58	9.3
Membranas no vesiculadas	3.33	12.6
Membranas plasmáticas	0.24	2.2

En la actualidad la identificación y purificación de los antígenos de superficie se ha facilitado por el empleo de anticuerpos monoclonales (AcM).

Se han descrito algunos AcM contra componentes de MP de Entamoeba histolytica obtenidos a partir de la inoculación de trofozoítos íntegros. Brunce (56) reporta 7 que reconocen un antígeno de superficie de 96 Kd presente en tres cepas patógenas de Entamoeba histolytica, en tanto Ortiz Ortiz y col. reportan un anticuerpo dirigido contra un epítipo que se localiza en tres cadenas polipéptidicas de diferentes pesos moleculares relacionadas con la MP y que es específico para Entamoeba histolytica (57); Ravdin y col. reportan AcM que inhiben la adherencia *in vitro* de Entamoeba histolytica a células de ovario de hamster (58), Agundis y col. obtuvieron AcM contra una glucoproteína (GP) de membrana de Entamoeba histolytica (59). Estos autores encontraron 7 hibridomas productores de AcM de la clase IgM contra GP; de éstos, 3 reconocen también a la lipopeptidofosfoglicana (LPFG). La capacidad de reaccionar de los AcM contra las 2 moléculas desaparecieron para todos los positivos contra LPFG cuando fue tratada con metaperiodato. Con lo que se dedujo que algunos AcM reconocen como epítipo la porción polisacáridica, por lo que pudo inferirse que están dirigidos contra la superficie y se perfilan como candidatos óptimos para su uso en un método de diagnóstico.

La inmunoelectrotransferencia mostró el reconocimiento de una sola banda con peso aproximado de 30-35 Kd con los AcM y para sueros de pacientes con AHA se encontró que entre otras bandas reconocen a la misma que reconocen los AcM probados.

La falta de antígenos puros ha limitado la correcta interpretación de las pruebas utilizadas en la evaluación de la respuesta inmune así como en la interpretación de los resultados de estudios epidemiológicos (60) ya que en todos ellos se usaron indiscriminadamente diferentes preparaciones antigénicas provenientes de diversas cepas ambientales.

4.- OBJETIVOS.

4.1.- Objetivo general.

Evaluar la actividad protectora de una glucoproteína de aproximadamente 30-35 Kd en la formación de abscesos hepáticos amibianos, utilizando un modelo experimental animal (gerbilos).

4.2.- Objetivos particulares.

a) Obtención de una fracción glucoproteica en un medio enriquecido en membranas obtenidas de un cultivo axénico de Entamoeba histolytica de la cepa HM1:IMSS.

b) Caracterizar inmunológicamente la fracción glucoproteica por la técnica de doble inmunodifusión radial.

c) Determinar la respuesta inmune humoral por la prueba inmunoenzimática en fase sólida.

c) Evaluar respuesta inmune celular mediante la técnica de transformación blastoide.

d) Determinar la protección que confiere la inmunización con la glucoproteína contra el reto de la amiba mediante la observación macroscópica y microscópica del hígado.

5.- MATERIALES Y METODOS.

5.1.- OBTENCION DEL ANTIGENO.

5.1.1.- Cultivo de trofozoitos de E. histolytica.

Se cultivaron trofozoitos de E. histolytica cepa HM1:IMSS en medio axénico de Diamond (2). Posteriormente se cosechan en su fase logarítmica de crecimiento a las 72 h de cultivo.

5.1.2.- Obtención de una fracción glucoproteica.

Los trofozoitos de E. histolytica se cosecharon centrifugando a 255 G durante 15 min a 4°C. El paquete obtenido es lavado 6 veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1 M pH 7.2 y se resuspendió en un amortiguador de Tris 10 mM, MgCl₂ 1 mM con inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, acetato fenil mercurico 0.01 mM). Los trofozoitos se lisaron por congelación y descongelación, hasta observar microscópicamente ruptura total y, posteriormente se centrifugo a 23600 G durante 30 min a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en amortiguador de rompimiento (que es un amortiguador de fuerza iónica alta con la siguiente composición: Tris 50 mM, KCl 50 mM, (CH₃COO)₂ Mg 5 mM, acetato fenil mercurico 0.01 mM y Triton 0.2% pH 7.6), homogenizando con una varilla de vidrio, y permaneciendo en reposo toda la noche en cuarto frío. La fase del sobrenadante, donde se extrajo la FG se obtuvo centrifugando el homogenizado a 23600 G durante 20 min a 4°C (61,62).

5.1.3.- Determinación de proteínas.

La cuantificación de proteínas de la FG, se realizó de acuerdo al método de Lowry (63) empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia. (Sigma Co).

5.2.- CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DEL ANTIGENO.

5.2.1.- Doble inmunodifusión radial.

La técnica de la doble inmunodifusión radial (DIR). Se realizó preparando geles de agarosa al 1.5% en solución salina isotónica 0.9% (SSI) que se vierten en caliente sobre portaobjetos limpios, produciendo una película de 1.5 mm de espesor. Los geles se incubaron en cámara húmeda durante 24 h a 4°C. Se colocó 30 μ l de muestra en pozos previamente perforados y se incubaron en cámara húmeda a 37°C durante 24 h. Los geles se lavaron en NaCl 0.1 M en agitación suave durante 24 h, y en agua destilada de la misma forma. Después del lavado, los geles se secaron en la estufa, se tñieron con solución colorante durante 30 min, y se destñieron con solución decolorante (64).

5.3.- OBTENCION DEL CONJUGADO (ANTI-GAMMAS GLOBULINAS DE GERBILOS UNIDA A PEROXIDASA).

Las gammas globulinas (γ) de gerbilos fueron obtenidas por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 33%. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Lowry (63). El suero de

conejo anti-gerbilo se obtuvo por inmunización de un conejo de 4 Kg de peso con γ totales (1 mg/Kg de peso), emulsificado con adyuvante completo de Freud (ACF) volumen a volumen, los días 0, 7, 14, y 21. El día 28 se sangró el conejo y se procedió a centrifugar para la obtención del suero, posteriormente se realizó una DIR y purificación de las γ de conejo anti- γ de gerbilo por el método de precipitación ya mencionado.

- Preparación del conjugado con peroxidasa.

Para la preparación del conjugado según la técnica de dos pasos descritas por Avrameas (65).

Se disolvieron 10 mg de peroxidasa (tipo VI Lote 125F9645 Sigma Co.) en 0.5 ml de glutaraldehído al 1%, en PBS 0.1 M, pH=6.8 . La preparación se mantuvo por 18 h a temperatura ambiente para posteriormente eliminar a través de una columna de Sephadex G-25 (fino), equilibrada con NaCl 0.15 M el exceso de glutaraldehído. Se recolectaron las fracciones coloreadas (café) que contenían la peroxidasa activa.

Las γ de conejo anti-gerbilos, previamente dializadas contra NaCl 0.15 M, se concentraron a 6.5 mg/ml. Se adicionó 1 ml de peroxidasa más 1 ml de las γ anti-gerbilos en 0.1 ml de amortiguador de carbonatos 1M pH=9.5, se mantuvo la preparación por 24 h a 4°C. Finalmente, después de adicionar 0.1 ml de solución de lisina 1M, se dializó contra PBS pH=7.2 durante 24 h y se alicuotó en fracción de 50 μ l.

5.4.- ENSAYO INMUNOENZIMATICO EN FASE SOLIDA (ELISA).

5.4.1.- Titulación del conjugado por ELISA.

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (NUNC-Immuplate I, Dinamarca). Los pozos fueron sensibilizados con γ de gerbilo a diferentes concentraciones (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 y 0.156 $\mu\text{g/ml}$) en amortiguador de carbonatos pH=9.5. Después de 1 h de incubación a 37°C y de 24 h a 4°C, bloqueamos todos los pozos con 300 μl de PBS-gelatina 2% durante 2 h a 37°C. Pasado el tiempo, las placas fueron lavadas 6 veces con PBS-Tween 0.1%. Posteriormente se agregó el suero de conejo (SC) anti- γ de gerbilo unida a peroxidasa en una mezcla de suero fetal bovino (SFB) y suero normal de cabra (SNC) al 1% a diferentes diluciones (1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:5000 y 1:6000) y se incubó durante 1.5 h a 37°C. Después de este período, las placas fueron lavadas como se mencionó anteriormente y el revelado de la reacción se realizó agregando 100 μl del sustrato (orto-fenilendiamina, H_2O_2 , amortiguador de citratos pH 5.6) e incubando por 20 min a temperatura ambiente, al final la reacción se detuvo con 25 μl de H_2SO_4 2.5 N. Las placas fueron leídas a 490 nm. en un lector de ELISA (MINI-READER II, Dinattec, Virginia, U.S.A).

Pozos testigos:

Pozo # 9: testigo del suero.

Pozo # 10: testigo del conjugado.

Pozo # 11: testigo positivo.

Pozo # 12: testigo negativo.

5.4.2.- Estandarización de la prueba de ELISA.

Los pozos se recubrieron con 100 μ l de FG en amortiguador de carbonatos pH=9.5 a diferentes concentraciones (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 y 0.156 μ g/ml). Después de 1 h de incubación a 37°C y de 24 h a 4°C se lavaron y bloqueamos con 300 μ l de solución PBS-Gelatina 2% en todos los pozos durante 2 h a 37°C. Pasado el tiempo, se lavaron 6 veces con PBS Tween 0.1%. Posteriormente se agregaron 100 μ l de los sueros inmunes en SFB y SNC al 1% a diferentes diluciones (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 y 1:6400). Se incubó a 37°C durante 1.5 h. Después de este período, las placas fueron lavadas como se mencionó anteriormente y se agregó 100 μ l de SC anti- γ de gerbilo unida a peroxidasa diluido 1:500 en SFB y SNC al 1%. Todo se mantuvo a 37°C durante 1.5 h y los lavados de las placas; el revelado, la lectura de la reacción y los testigos se realizarán como se mencionó en el inciso anterior.

5.4.3.- Titulación de anticuerpos anti-glucoproteína.

Los pozos fueron recubiertos con 100 μ l de la FG (10 μ g/ml) en amortiguador de carbonatos pH 9.5. Después de 1 h de incubación a 37°C y toda la noche a 4°C, se agregaron los sueros inmunes a diferentes diluciones (1:50, 1:100 y 1:200) incubándose a 37°C durante 1 h. Posteriormente se agregó el conjugado SC anti- γ de gerbilo unida a peroxidasa a una dilución de 1:500. Los lavados, el bloqueo, los testigos, el revelado y la lectura de la reacción se realizó como se mencionó anteriormente.

5.5.- FORMACION DE ABSCESO HEPATICO AMIBIANO (AHA).

5.5.1.- Animal de experimentación.

Los gerbilos fueron encontrados en la región de Asia, especialmente China, Mongolia e India. Taxonomía: Orden Rodentia, Sub-orden Myomorpha, a nivel de familia hay tres clasificaciones: Familia Muridae, Sub-familia Gerbillinae, Familia Gerbillidae, Familia Cricetidae, Sub-familia Gerbillinae.

Se utilizaron gerbilos machos de 7 a 8 semanas con un peso promedio de 40 g (Mongolian gerbil), fueron mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Higiene de la Gerencia General de Biológicos y Reactivos de la Secretaría de Salud.

5.5.2.- Método intrahepático para producir AHA.

El animal se anestesió por vía intramuscular con dihidrobenziperidol 6.25 mg/Kg de peso y Ketamina 125 mg/Kg de peso, posteriormente es rasurado el abdomen y desinfectada la región con solución de yodo. Se realiza una incisión longitudinal en la cavidad abdominal de aproximadamente 1 cm. El hígado se expone para inocularle amibas lentamente con una jeringa hipodérmica. Al retirar la jeringa, en el lugar de la incisión se coloca una pequeña torunda estéril para limpiar la herida y posteriormente se cerró la pared abdominal, primero cosiendo el peritoneo con Nylon dermalon calibre 5-0 y después la piel con Ethibond 000.

5.5.3.- Estandarización de la dosis infectante.

Se utilizaron 14 gerbilos por experimento.

La vía de inoculación fué intrahepática.

No. de gerbilos	Dosis de trofozoítos
6	$1.5 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$
6	$2.5 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$

Como grupo testigo se empleó:

a) 2 gerbilos inoculados intrahepáticamente con SSI estéril.

El ensayo se repitió 2 veces.

5.5.4.- Sacrificio de los gerbilos.

Terminada la operación, los animales son aislados.

Transcurridos 9 días, el gerbilo es sacrificado en cámara de éter, con el fin de abrir el abdomen y observar la formación de AHA.

5.6.- INMUNIZACION DE GERBILOS CON LA FRACCION GLUCOPROTEICA.

5.6.1.- Esquema de inmunización con adyuvante.

Se inmunizaron 8 gerbilos con una mezcla de FG más $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante (volumen a volumen), como se indica en el esquema

siguiente:

<u>Día</u>	<u>Vía</u>	<u>FG µg/ml</u>	<u>Reto con trofozoítos</u>
0	Subcutánea	100	---
7	Subcutánea	100	---
14	---	---	2.5 X 10 ⁶
			Vía intrahepática
23	Sacrificio de animales.		

como grupos testigos se emplearon:

- a) 4 gerbilos inmunizados con SSI estéril, de acuerdo al esquema de inmunización, y retados con 2.5 X 10⁶ de trofozoítos de Entamoeba histolytica, estandarizada previamente.
- b) 2 gerbilos sin inmunización ni reto.

5.7.- OBTENCION DE SUERO.

5.7.1.- Punción por plexo retro orbital.

La obtención del suero de gerbilo se realizó introduciendo una pipeta Pasteur en el plexo retro orbital del animal previamente anestesiado. El suero se obtuvo centrifugando la sangre a 1593 G por 10 min (día 0 y 14 del esquema de inmunización).

5.7.2.- Punción cardíaca.

La punción cardíaca se realizó introduciendo una jeringa

hipodérmica en la región torácica del animal anestesiado en cámara de éter; el suero se obtuvo como se indicó anteriormente (día 21).

5.8.- ENSAYO DE ACTIVACION *in vitro*.

5.8.1.- Obtención de células de bazo.

Los gerbilos se sacrificaron en cámara con éter y se extrajo el bazo en condiciones de esterilidad. Los esplenocitos se obtuvieron por disgregación mecánica del bazo y se lavaron con solución de Hanks, a 255 g, 10 min. Los eritrocitos presentes se eliminaron por lisis con NH_4Cl 0.16 M, Tris-HCl 0.17 M, pH=7.6. Las células se recuperaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con SFB al 10%, antibióticos (penicilina y gentamicina), 2 β -mercaptoetanol 2×10^{-5} M y L-glutamina. La concentración celular se ajustó contando las células viables en cámara de Neubauer mediante tinción con azul tripano.

5.8.2.- Ensayo de activación con mitógenos.

Los esplenocitos se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml, y se cultivaron 200,000 células por pozo en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano (NUNC), agregándose concentraciones variables de Con A tipo IV-S (Sigma Co.).

Las células se cultivaron durante 5 días a 37°C, en cámara

humeda y 5% de CO₂; 18 h antes de terminar el cultivo se agregó 1 μ Ci de timidina tritiada (³HTDr, Amersham International 5 mCi de actividad específica) por pozo. Las células se transfirieron a papel de fibra de vidrio mediante un cosechador semiautomático (Mini Mash II). La cantidad de material radioactivo incorporado a la célula se determinó, utilizando un contador de centelleo líquido (Beckman LS 580).

5.8.3.- Ensayo de activación antígeno específico.

Los esplenocitos, provenientes de gerbilos inmunes y no inmunes se cultivaron en placas de 96 pozos (NUNC), a una concentración de 200,000 células/pozo en 200 μ l de medio DMEM complementado y se les agregó FG a diferentes concentraciones (50, 30, 10, 5) μ g. Como testigo se utilizó Con A 5 μ g/ml.

Las células se cultivaron y su activación se evaluó en las condiciones descritas para la activación con mitógenos.

5.9.- ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL HIGADO.

5.9.1.- Estudio histológico.

Una vez extraído el hígado de los animales, fue colocado inmediatamente en un recipiente con formol 10% amortiguado con PBS pH 7.2 (10 partes de formol por cada volumen de tejido). En este fijador permanecieron durante 12 horas por lo menos. Posteriormente el hígado fué seccionado longitudinalmente con una

hoja de bisturí cada 5 mm y se escogieron los cortes que macroscópicamente evidenciaron lesiones.

Los cortes tomados se procesaron automáticamente en un equipo de deshidratación con alcoholes en concentraciones crecientes y embebidos en xilol y parafina (Merck). Los fragmentos se incluyeron en bloques de parafina, y se cortaron con un microtomo (American optical) a 4 μ m de espesor; eliminando la parafina en un horno a 56°C y tñiendolos con la técnica de Hematoxilina-Eosina. Posteriormente se observaron bajo un microscópio óptico seleccionando los campos representativos.

6.- RESULTADOS.

6.1.- DIR.

La figura 1 muestra que la FG es reconocida por los sueros de gerbilos anti-GP como por SC anti-amiba total. Todos los sueros anti-GP obtenidos en diferentes animales presentaron una sola banda lo que indica que la FG contiene un epitopo inmunodominante, en cambio cuando se utilizó SC anti-amiba total además de reconocer la banda anterior presentó una banda de no identidad.

En la figura 2 representa el reconocimiento y el título de anticuerpos anti- γ de gerbilos obtenidos después de cuatro inmunizaciones con γ de gerbilo más ACF (1 mg/Kg de peso) en conejo, dando varias bandas de reconocimiento e identidad.

6.2.- Titulación del conjugado por ELISA.

En la tabla 3 y figura 3 se observa que los títulos de anticuerpos anti- γ de gerbilos presentan un máximo a una dilución de 1:500 con 10 μ g de γ .

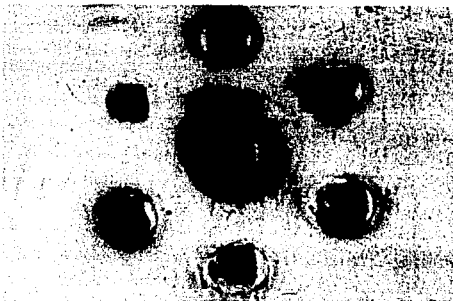


Figura 1: DIR DE LA FG.

(A) FG. (1,3,4) Suero de gerbilo anti-GP. (2) SC anti-amiba. (5) Suero de gerbilo normal. (6) SSI.

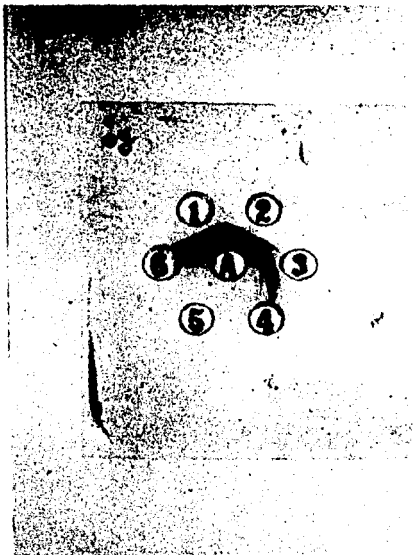


Figura 2: DIR DE LAS T DE GERBILO.

(A) T de conejo anti-T de gerbilo. (1,2) T de gerbilo 1 mg/ml. (3) T 100 μ g/ml. (4) T 10 μ g/ml. (5) T 1 μ g/ml. (6) SSI.

Tabla 3: TITULOS DE ANTICUERPOS ANTI- δ DE GERBILO
UNIDA A PEROXIDASA.

FG $\mu\text{g/ml}$	Inverso de la dilución anti- δ					
	500	1000	2000	4000	5000	6000
20.0	1.0	0.8	0.58	0.38	0.25	0.2
10.0	1.0	0.66	0.5	0.29	0.2	0.18
5.0	0.91	0.55	0.31	0.19	0.17	0.1
2.5	0.87	0.2	0.18	0.1	0.08	0
1.25	0.68	0.18	0.15	0.08	0	0
0.625	0.47	0.1	0.07	0	0	0
0.312	0.22	0.06	0.03	0	0	0
0.156	0.11	0.05	0	0	0	0

Lecturas de D.O. A 490 nm

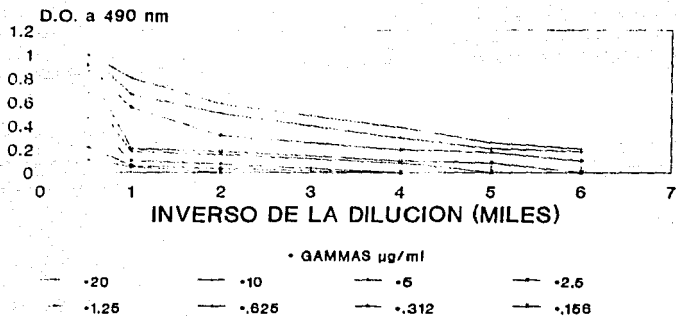


Figura 3: TITULACION DEL CONJUGADO γ DE CONEJO ANTI- γ DE GERBILO UNIDA A PEROXIDASA POR ELISA.

6.3.- Estandarización de la prueba de ELISA.

En la tabla 4 y figura 4 se representa que los títulos de anticuerpos anti-GP presentan un máximo de absorbancia a una dilución 1:100 con 20, 10 µg/ml, por lo tanto los sueros inmunes se trabajarán a una dilución comprendida entre un rango de 1:50 a 1:200.

6.4.- Titulación de anticuerpos anti-GP.

La tabla 5 y figura 5 representa la activación de la respuesta humoral hacia GP, que se refleja con un ligero incremento de anticuerpos anti-GP.

6.5.- Estandarización de la dosis infectante.

- Clasificación de los AHA (magnitud).

Para describir las lesiones hepáticas, se clasificaron los AHA en 4 tipos diferentes.

- + Microabsceso: Solamente uno, caracterizado por una área bien circunscrita, pequeña, de color blanco y de consistencia dura.

++ Abscesos mediano: De 2 a 3 abscesos, localizados en un solo lóbulo y caracterizado por áreas circunscritas de aproximadamente 3mm, color blanco y consistencia dura.

+++ Abscesos grandes: De 2 a 3 abscesos localizados en diferentes partes del hígado, color blanco, de consistencia dura y además con adherencias al diafragma y a las asas intestinales (extensión de las lesiones).

++++ Abscesos muy grandes: Múltiples abscesos en todo el hígado, con necrosis total y además con adherencia al diafragma, pared abdominal y las asas intestinales.

Los resultados se encuentran en la tabla 6 y figura 6. Con la dosis de trofozoítos (1.5×10^6) se observa que en su mayoría se forman abscesos medianos (++) y con 2.5×10^6 de trofozoítos se observaron en su totalidad abscesos muy grandes (++++).

Tabla 4: ESTANDARIZACION DE ELISA PARA DETERMINAR LOS TITULOS DE ANTICUERPOS ANTI-GP EN SUEROS DE GERBILOS.

FG $\mu\text{g/ml}$	Inverso de la dilución del suero anti-GP						
	50	100	200	400	800	1600	3200
20.0	0.252	0.269	0.178	0.062	0.073	0.0	0.0
10.0	0.235	0.249	0.117	0.039	0.057	0.0	0.0
5.0	0.244	0.240	0.148	0.036	0.039	0.0	0.0
2.5	0.204	0.208	0.105	0.104	0.023	0.0	0.0
1.25	0.165	0.171	0.088	0.024	0.025	0.0	0.0
0.625	0.136	0.135	0.062	0.0	0.0	0.0	0.0
0.312	0.120	0.117	0.049	0.0	0.0	0.0	0.0
0.156	0.121	0.093	0.028	0.0	0.0	0.0	0.0

Lecturas de D.O. a 490 nm.

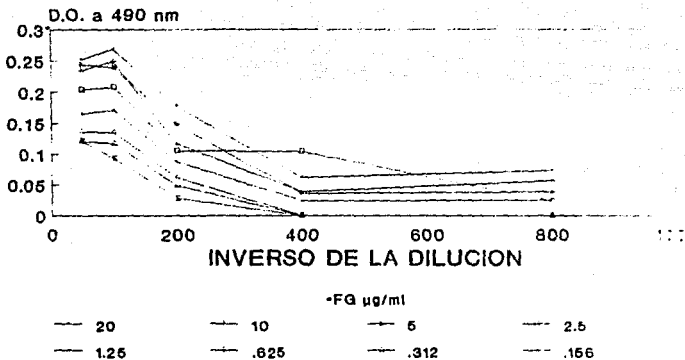


Figura 4: ESTANDARIZACION DE ANTICUERPOS ANTI-GP EN SUERO DE GERBILO.

Gerbilos inmunizados los días 0, 7 con 100 µg de FG y sacrificados el día 14.

Tabla 5: EVALUACION DE LA RESPUESTA HUMORAL EN SUEROS DE GERBILOS INMUNES.

DIA	Inverso de la dilución del suero inmune de gerbilo				
	50	100	200		
0	x	0.2865	0.208	0.1543	
	σ	0.00776	0.0232	0.0195	
14	x	0.445	0.241	0.176	GRUPO 1
	σ	0.0134	0.00889	0.00424	
23	x	0.509	0.363	0.284	
	σ	0.0622	0.00494	0.0197	
0	x	0.2585	0.1915	0.185	
	σ	0.0122	0.0148	0.0106	
14	x	0.252	0.1856	0.174	GRUPO 2
	σ	0.0654	0.0438	0.00989	
23	x	0.3605	0.268	0.209	
	σ	0.0361	0.0182	0.00989	

Lectura de D.O. a 490 nm.

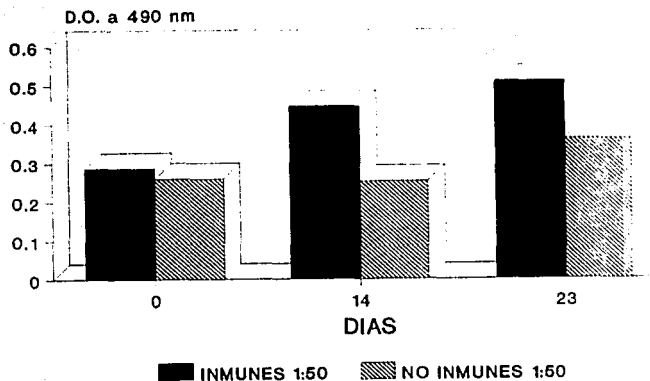


Figura 5: RESPUESTA DE ANTICUERPOS ANTI-GP EN SUEROS DE GERBILOS.

Grupo 1 inmunizados el día 0, 7 con 100 μ g de FG y retados el día 14 con 2.5×10^6 trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. Grupo 2 inoculados con SSI los días 0, 7 retados con 2.5×10^6 de trofozoítos el día 14 y Grupo 3 control negativo .

Tabla 6: ESTANDARIZACION DE LA DOSIS INFECTANTE.

Dosis de trofozoitos	Número de gerbilo	Tipo de AHA	% Formación de AHA
1.5 x 10 ⁶	1	-	91
	1	+	
	6	++	
	3	+++	
	1	++++	
2.5 x 10 ⁶	12	++++	100

(-) Ausencia de AHA.

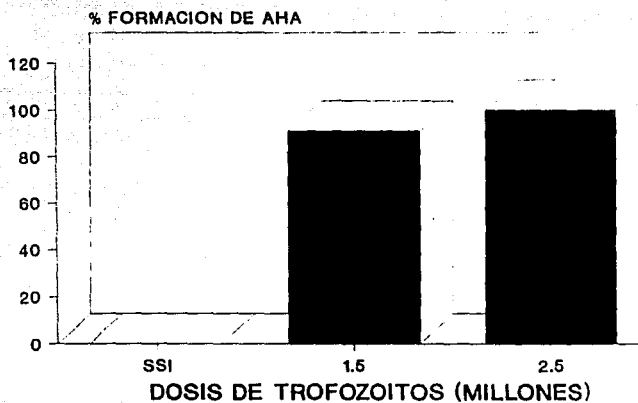


Figura 6: ESTANDARIZACION DE LA DOSIS INFECTANTE.

Inoculación intrahepática de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* cepa HMI:INSS (dosis 1.5×10^6 y 2.5×10^6).

A)



Figura 7: FOTOGRAFIAS DE FORMACION DE AHA.

A) Tipo de AHA: microabsceso (+)

B) Tipo de AHA: absceso muy grande (++++)

C) Hígado normal.

B)



c)



6.6.- Evaluación de la protección.

La evaluación de la actividad protectora en gerbilos inmunizados con 100 μg (días 0, 7), retados con 2.5×10^6 trofozoítos (día 14) y sacrificados el día 23 se realizó por la observación macroscópica y microscópica del hígado, en donde los hígados de los gerbilos inmunes mostraron la formación de AHA al igual que los controles positivos (en los cuales se obtuvo el 100% de la formación de AHA) comparados con los controles negativos. Los resultados se muestran en la tabla 7 y figura 8 observandose en su mayoría la formación de abscesos muy grandes (++++) tanto en gerbilos inmunes como en controles positivos.

6.7.- Ensayo de activación con mitógenos.

En la figura 9 se observa la incorporación del material radioactivo a los esplenocitos, que fueron activadas inespecíficamente con Con A a diferentes concentraciones.

6.8.- Ensayo de activación antigeno específico

En la figura 10 se observa la estandarización de activación de esplenocitos totales en gerbilos inmunes, con diferentes concentraciones de FG (50, 30, 10, 5 μg), observandose que la GP no activa la respuesta inmune celular.

La evaluación de la respuesta inmune celular en gerbilos (grupo 1, 2 y 3) contra la GP (50,30 μg) no activa a los

esplenocitos. Para el caso de la estandarización y de la evaluación se contaba con un testigo de viabilidad a la concentración óptima (Con A 5 $\mu\text{g/ml}$).

6.9.- Estudio histológico

El estudio histológico de los hígados en el que se indujo la formación de AHA, microscópicamente se observaron abscesos constituidos por una porción central de forma irregular que contiene material amorfo, eosinófilo, con fantasmas celulares y numerosos trofozoítos de amibas en diferentes estadios de degeneración, localizadas generalmente hacia el borde de la lesión, este borde está formado por necrosis coagulativa, restos nucleares y células inflamatorias principalmente leucocitos polimorfonucleares. Después de este borde se observaron numerosas células mononucleares y gran cantidad de macrófagos epiteloideas, fusiformes ó multinucleados mezclados con linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos y fibroblastos en grado variable así como restos de hepatocitos, vasos sanguíneos y conducto biliar intrahepático.

Todas estas lesiones estaban a su vez bien limitadas del parénquima vecino, en este último se observaron signos de compresión, congestión y aumento de las células mononucleares en los espacios porta; en forma aislada se encontraron conglomerados de células mononucleares en el parénquima. No se encontraron amibas fuera de los abscesos.

Dos de los especímenes observados no mostró alteraciones macroscópicas ni microscópicas (control negativo).

Los hígados del estudio de protección, macroscópicamente presentaron abscesos tanto en los gerbilos inmunizados como en los no inmunizados. En el estudio microscópico se observaron las mismas características mencionadas anteriormente, por lo que concluimos que los abscesos son amibianos (figura 11).

Los hígados provenientes de los controles negativos no presentaron ninguna lesión.

Tabla 8: EVALUACION DE LA PROTECCION.

Gerbilos inmunes:

No. de gerbilos	Tipo de AHA	% Formación de AHA
2	+++	100
6	++++	

Controles positivos:

No. de gerbilos	Tipo de AHA	% Formación de AHA
1	++	100
3	++++	

controles negativos:

No. de gerbilos	Tipo de AHA	% Formación de AHA
2	---	0

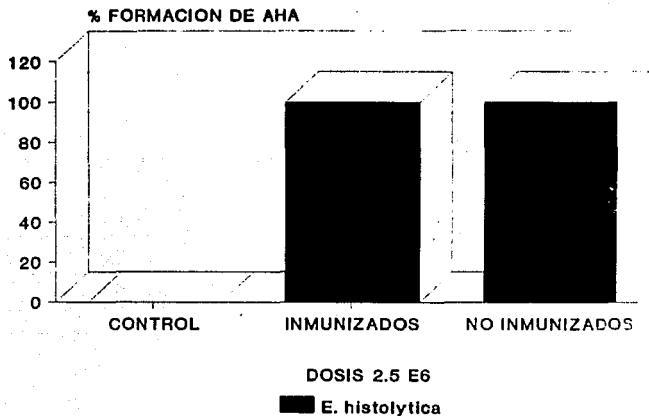


Figura 8: GRAFICA DE EVALUACION DE PROTECCION.
 Gerbilos inmunizados con 100 µg de FG y gerbilos inoculados con SSI (días 0, 7) retados con 2.5×10^6 de trofozoitos de Entamoeba histolytica cepa HM1:IMSS y sacrificados el día 23.

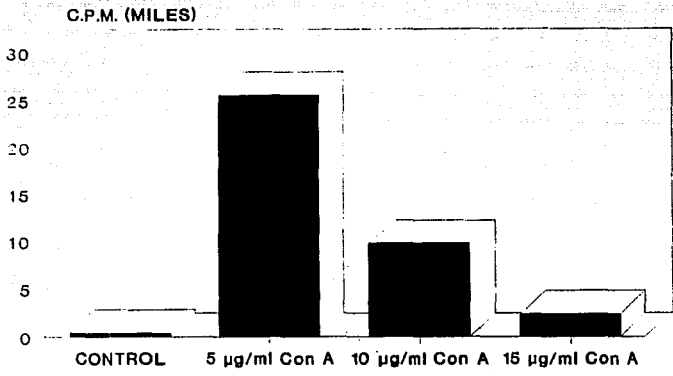


Figura 9: ENSAYO DE ACTIVACION CON Con A.

Estimulación de esplenocitos de gerbilo con diferentes concentraciones de Con A (5, 10, 15 µg/ml).

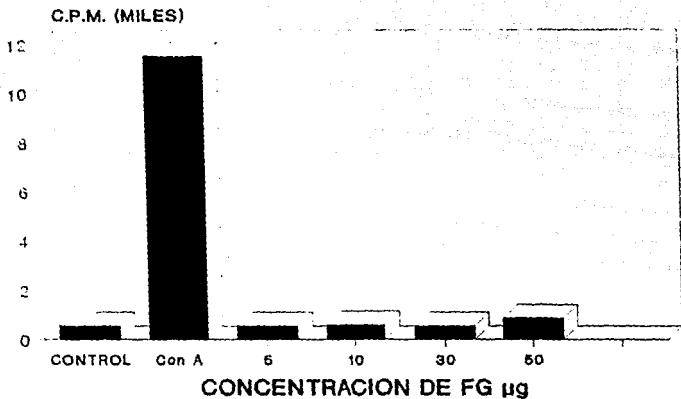


Figura 10: ENSAYO DE ACTIVACION ANTIGENO ESPECIFICO.

Estandarización de la activación de esplenocitos en gerbilos inmunes con diferentes concentraciones de antígeno (50, 30, 10, 5 µg de FG). Los gerbilos se inmunizaron con 100 µg de FG los días 0, 7 y sacrificados el día 14.



Figura 11: Estudio histológico.

A) Observación de cortes de hígado en gerbilo con AHA (++++), procesados con la técnica de tinción de Hematóxilina-Eosina.

7.- DISCUSION.

Los antígenos de superficie de Entamoeba histolytica son los primeros en ser reconocidos por las células inmunocompetentes para desencadenar una respuesta en contra del parásito.

La FG extraída de un cultivo axénico de E. histolytica cepa HM1:IMSS, muestra un patrón electroforético de aproximadamente 13 bandas. La fracción de peso molecular de 30-35 Kd corresponde a un antígeno de superficie inmunodominante. Esto fue determinado por técnicas de inmunopunto y SDS-PAGE inmunoelectrotransferencia (59). La primera se determinó con ACM dirigidos contra la GP y la segunda con un patrón de corrimiento electroforético de las glucoproteínas reveladas con suero de paciente con AHA y AcM. Con esto último se encontró que el ACM reconoce solo una banda de peso molecular de aproximadamente 30-35 Kd, mientras que el suero de paciente con AHA reconoce además de otras bandas a la misma que el AcM.

En el presente trabajo se demostró que efectivamente la GP es inmunodominante, ya que con la técnica de DIR (figura 1), se observa una sola banda de identidad frente a sueros de gerbilos inmunizados con la FG. El SC anti-amiba total reconoce la misma banda entre otras.

Para evaluar la respuesta inmune humoral se usó la prueba de ELISA, por lo que fue necesario estandarizar el sistema. Para ello fue necesario preparar el conjugado γ de conejo anti- γ de

gerbilo unida a peroxidasa. La dilución óptima de 1:500 del conjugado se determinó (figura 3) empleando el criterio de que la lectura que representa mayor densidad óptica a una concentración mínima de antígeno, dá la mayor sensibilidad del ensayo. Los títulos de anticuerpos anti-GP fueron estandarizados siguiendo el mismo criterio (figura 4), obteniéndose una concentración óptima de 10 µg/ml del antígeno a una dilución 1:100. Para fines del ensayo de evaluación de la protección, los títulos de anticuerpos se midieron bajo condiciones mencionadas, sólo la dilución del suero de gerbilo se realizó entre un rango de 1:50 - 1:200 afin de contar con resultados más representativos, ya que los gerbilos utilizados son cepas abiertas y no responden igual por la variación biológica propia.

La evaluación de la protección se determinó por observación macroscópica y microscópica del hígado. Para este ensayo se estandarizó la dosis infectante de trofozoítos de Entamoeba histolytica mediante la inoculación intrahepática. La dosis óptima utilizada fue de 2.5×10^6 de trofozoítos (figura 6); éste produjo el 100% de formación de AHA (tipo ++++).

En la evaluación de la respuesta humoral en gerbilos del grupo 1, inmunizados con la FG los días 0, 7 y retados el día 14 se observó un ligero incremento de títulos de anticuerpos anti-GP (figura 5); comparado los diferentes días (0, 14, 23) fue aproximadamente dos veces mayor que su título basal (el día 0 al 14). Después del reto se observa un ligero incremento de anticuerpos. Los títulos observados de los gerbilos del grupo 2

inoculados con SSI en los días 0, 14 corresponden a títulos basales, con un ligero incremento después del reto con trofozoítos de E. histolytica. El título de anticuerpos del día 23, comparado con el de los gerbilos del grupo 1 y 2 fue menor para el grupo 2; ya que posiblemente a estos gerbilos, después del reto, sólo les indujo una respuesta primaria. En el grupo 1, donde hubo 2 inmunizaciones (día 0, 7), reto con trofozoítos (día 14) y sacrificados el día 23, se encontró una respuesta primaria y secundaria baja.

Previa a la activación de esplenocitos totales con el antígeno FG, se determinó la concentración óptima del control de viabilidad con Con A; ésta fue de 5 $\mu\text{g/ml}$ (figura 9). El ensayo de activación de gerbilos inmunes y no inmunes con la FG para evaluar la respuesta celular demostró que no hubo activación de esplenocitos totales (figura 10). La activación se midió por la incorporación de timidina tritriada reportándose en C.P.M.. El control de viabilidad utilizando Con A reportó un incremento de las C.P.M. en comparación con el control de células solas. Esto se hizo para dar confiabilidad a los resultados, pues los esplenocitos no proliferaron porque no son activados por el antígeno y no por pérdida de viabilidad por un manejo inadecuado de los esplenocitos.

La evaluación de la protección de los gerbilos inmunes y no inmunes retados con 2.5×10^6 de trofozoítos, se determinó primero por observación macroscópica del hígado: Los hígados de los gerbilos tanto inmunes como controles tuvieron AHA (en su

mayoría ++++). La formación de AHA para ambos grupos fué del 100% (figura 8).

En el estudio histológico de los hígados se reportaron abscesos hepáticos amibianos (figura 11), con necrosis coagulativa de bordes irregulares con varios trofozoítos dentro de las lesiones, además de la presencia de células inflamatorias y células inmunocompetentes delimitando el área de las lesiones. Este estudio confiere confiabilidad en la conclusión final del proyecto, determinando que las lesiones observados efectivamente son AHA y corrobora los resultados obtenidos de la observación macroscópica de los hígados.

Algunos autores han evaluado la inmunidad protectora anti-amibiana empleando hámster como modelo experimental, así Meerovitch en 1978 (66) reportó la protección conferida a estos animales por un solo inocúlo de 20×10^6 de trofozoítos por vía intradérmica y posterior reto (24 días después) con 5.5×10^6 de trofozoítos por vía intrahepática, igualmente Sepulveda y col. en ese mismo año (67) utilizando fracción lisosomal, ribosomal citoplasmica y una fracción citoplasmatica semipurificada (por filtración en gel) de Entamoeba histolytica reportaron que todos conferían protección al hámster dorado después de tres inmunizaciones con ó sin fosfato de aluminio como adyuvante y reto posterior por vía intrahepática con 1.5×10^6 de trofozoítos .

Portnoy, G. y col. (68) reportan un antígeno estable de Entamoeba histolytica que tras tres inmunizaciones y reto posterior intrahepático con trofozoitos confiere protección al hámster.

Es conveniente hacer notar que en el caso de Meerovitch la inoculación intradérmica de una gran cantidad de amibas provocó lesiones, cuatro días después con posterior ulceraciones del área circuncindante y que el título de anticuerpos séricos medidos antes de la inoculación intrahepática fue bajo; títulos que se elevaron al final del experimento.

Otros autores como Sepulveda y col. (67) reportaron protección en el 90-100% de los casos y buenos títulos de anticuerpos, evaluados al final del experimento, situación que no vemos con el uso o no de fosfatos de aluminio como adyuvante, así mismo emplearon tres inmunizaciones de 150 µg cada uno de ellos para la fracción ribosómica, lisosómica y soluble semipurificada y para la fracción soluble no purificada de 800 µg. Finalmente Ortiz-Ortiz con inmunización subcutánea, con dosis de 1 mg cada vez (3 en total) y reto con 1.5×10^6 de trofozoitos, ocho semanas después observó tanto protección como buena respuesta inmune (68).

En base a estos estudios y en virtud de que nuestros experimentos de protección se realizaron con solo dos inmunizaciones previas al reto y con dosis muy por debajo de las empleadas por estos autores y considerando la anergia específica

transitoria reportada durante la evolución del AHA semejantes a la descrita en otras enfermedades infecciosas (69) no podemos descartar el posible efecto protector del antígeno evaluado, por lo que se seguirá trabajando al respecto con diferentes dosis y tiempos de inmunizaciones.

8.- CONCLUSIONES.

1.- La inmunización con 100 µg de FG (días 0,7) no confirió protección a reto intrahepático con 2.5×10^6 de trofozoítos de Entamoeba histolytica cepa HM1:IMSS.

2.- La ausencia de protección se determinó en la formación de AHA, que para todos los casos fué positivo (grupo 1 y 2) y negativo para el grupo 3, observandose el 100% de formación de AHA de tipo muy grande (++++).

3.- En la estandarización de la dosis infectante, el tipo de abscesos que predominó fué muy grande (++++) y de una manera comparativa podemos decir que la GP no disminuyó de manera significativa el grado de lesiones presentados en los gerbilos inmunizados con los no inmunizados, para ambos casos el tipo de AHA predominante fué de muy grande (++++).

4.- La falta de protección se debe a que la GP no es capaz de activar inmunidad celular a diferentes concentraciones y al pobre incremento de anticuerpos anti-GP que producen los gerbilos al ser inmunizados con $Al(OH)_3$ como adyuvante más GP.

Las perspectivas para la glucoproteína de aproximadamente 30-35 Kd es purificarlo y evaluarlo de manera similar al descrito, pero realizando una cinética de dosis respuesta para el antígeno afín de encontrar una posible concentración óptima de inmunización.

Con los AcM que reconocen la glucoproteína, se realizara una transferencia de inmunidad pasiva a gerbilos para posteriormente ser retados con trofozoítos de Entamoeba histolytica cepa HM1:IMSS.

Actualmente se está probando el antígeno y los AcM para la elaboración de una técnica eficaz para el diagnóstico de amibiiasis.

9.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- World Health Organization Expert Committee Amoebiasis. 1969 WHO. Tech. Rep. Ser. No. 421:1-52. Geneva.
- 2.- Diamond, L.S., Axenic cultivation of E. histolytica Science, 1961, 134:336.
- 3.- Martínez-Palomo, A. Biology of E. histolytica, Research study Press, Chichester, 1982:1-161.
- 4.- Guerrant, R. L. The global problem of amebiasis. Rev. Infect. Dis. 8, 218, 1986.
- 5.- Imperato, P. J. A historical overview of amebiasis. Bull.N.Y.Acad. Med. 57, 175, 1981.
- 6.- Kean, B. H. A history of amebiasis. In Amebiasis Human infection by Entamoeba histolytica. Ravdin, J. I. Ed. John Wiley and Sons, U.S.A., 1988, Chap. 1.
- 7.- Martínez-Báez, M. Historical introduction. In Amebiasis Martínez-Palomo, A. Ed., Elsevier, Amsterdam, 1986, Chap. 1.
- 8.- Ravdin, J. I. and Guerrant, R. L. A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. Rev. Infect. Dis. 4, 1185, 1982.

- 9.- Elsdon-Dew, R. (1968) The epidemiology of amoebiasis. Adv. Parasitol. 6, 1-62.
- 10.- Jeffrey, H. C. y Leach, R. M. (1975) Atlas of medical helminthology and protozoology. Churchill Livingstone eds. Edinburgh London. Second edition. pp 50.
- 11.- Raudin, J. I. (1986) Pathogenesis of disease caused by Entamoeba histolytica. Studies of adherence, secreted toxins and contact dependent cytotoxicity. Rev. Infect. Dis. 8, 247-260.
- 12.- Robinson, G.L. (1968) The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 62, 285-294.
- 13.- Sargeant, P.G. y Williams, J.E. (1979) Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 73, 225-227.
- 14.- Trissl, D. (1982) Immunology of E. histolytica in human and animal hosts. Rev. Infect. Dis. 4, 1154-1184.
- 15.- Juniper, K., Worrel, C.L., Minshew, M.C., Roth, L.S., Cypert, H. y Lloyd, R.E. (1972) Serological diagnosis of amoebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21, 157-167.

16.- Kotcher, E., Miranda, M., Garcia de Salgado, V. (1970) Correlation of clinical, parasitological and serological data of individuals infected with E. histolytica. Gastroenterology. 58, 338-391.

17.- Elsdon-Dew, R. (1970) The serology of amoebiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 18, 64.

18.- Healy, G.R., Kagan, I.G., Gleason, N.N. 1970. Use of the indirect hemagglutination test in some studies of seroepidemiology of amoebiasis in the western hemisphere. Health Laboratory Science. 7:109-116.

19.- Healy, G.R., Visvesvara, G.S., Kagan, I.G. 1974. Observations on the persistence of antibodies to E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex). 5 (Supl. 2): 495-500.

20.- Ghadirian, E., and Meerovitch, E., Hartman, D.P. 1980. Protection against amebic liver abscess in hamster by means of immunization with amebic antigen and some of its fractions. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29:779-784.

21.- Huld, G., Davies, P., Allison, A.C. and Scholmer, H.V. 1979. Interactions between E. histolytica and complement nature. 227:214-216.

22.- Ortiz-Ortiz,L.,L., Capín,W.R., Sepúlveda,B., and Zamacona,G. 1978. Activation of the alternate pathway of complement by E.histolytica. Clin. Exp. Immunol. 34:10-18.

23.- Sepúlveda,B., Chévez,A., Iturbe-Alessio,I., Ortiz-Ortiz,L. 1973. Efecto de la gammaglobulina inmune antiamebiana sobre el trofozoito de E. histolytica. Arch. Inves. Med. (Mex)4 (Supl.1):79-86.

24.- Ganguly,N.K., Mahajan,R.C., Datta, D.V., Sharma,S., Chhuttani,P.N. and Gupta,A.K. 1978. Immunoglobulin and complement levels in cases of invasive amoebiasis. Indian J. Med. Res. 67:221-226.

25.- Ravi,V.V., Mithal,S., and Tandon,B.N. 1975. Immunologic studies in amoebic liver abscess. Indian J. Med. Res. 63:1732-1736.

26.- Salata,R.A., and Ravdin,I.J. 1986. Review of the human immune mechanisms directed against E. histolytica. Rev. Infect. Dis. 8(2):261-272.

27.- Jarumilinta,R., and Kradolfer,F. 1964. The toxic effect of E.histolytica on leukocytes. Ann. Trop. Med. Parasitol. 58:375-381.

28.- Guerrant,R.L., Bruschi,J., Ravdin,J.I., Sullivan J.A., and Mandell,G.L. 1981. Interaction between E. histolytica and

22.- Ortiz-Ortiz,L.,L., Capín,W.R., Sepúlveda,B., and Zamacona,G. 1978. Activation of the alternate pathway of complement by E.histolytica. Clin. Exp. Immunol. 34:10-18.

23.- Sepúlveda,B., Chévez,A., Iturbe-Alessio,I., Ortiz-Ortiz,L. 1973. Efecto de la gammaglobulina inmune antiambiana sobre el trofozoito de E. histolytica. Arch. Inves. Med. (Mex)4 (Supl.1):79-86.

24.- Ganguly,N.K., Mahajan,R.C., Datta, D.V., Sharma,S., Chhuttani,P.N. and Gupta,A.K. 1978. Immunoglobulin and complement levels in cases of invasive amoebiasis. Indian J. Med. Res. 67:221-226.

25.- Ravi,V.V., Mithal,S., and Tandon,B.N. 1975. Immunologic studies in amoebic liver abscess. Indian J. Med. Res. 63:1732-1736.

26.- Salata,R.A., and Ravdin,I.J. 1986. Review of the human immune mechanisms directed against E. histolytica. Rev. Infect. Dis. 8(2):261-272.

27.- Jarumilinta,R., and Kradolfer,F. 1964. The toxic effect of E.histolytica on leukocytes. Ann. Trop. Med. Parasitol. 58:375-381.

28.- Guerrant,R.L., Bruschi,J., Ravdin,J.I., Sullivan J.A., and Mandell,G.L. 1981. Interaction between E. histolytica and

human polymorfonuclear neutrophils. J. Infect. Dis. 143:83-93.

29.- Ravdin, J.I. Murphy, C.F., Salata, R.A., Guerrant, R.L., and Hewlett, E.L. 1985. The N-acetyl-D-galactosamine inhibitable lectin of E. histolytica. I. Partial purification and relationship to amebic in vitro virulence. Infect. Dis. 141:816-822.

30.- Salata, R.A., Pearson, R.A., Murphy, C.F., and Ravdin, J.I. 1982. The interaction of E. histolytica with human polymorfonuclear leukocytes and monocytes. Clin. Res. 30:853A

31.- Ghadirian, E., and Meerovitch, E. 1980. Effect of immunosuppression on the size and metastasis of amoebic liver abscess in hamsters. Abstract. No. 12:8.10. In proceedings of the 4th. International congress of Immunology paris.

32.- Ghadirian, E., and Meerovitch, E. 1981. Effect of Immunosuppression on the size and metastasis of amoebic liver abscess in hamsters. Parasite. Immunol. 3:329-338.

33.- Ghadirian, E., and Meerovitch, E. 1981. Effect of Splenectomy on the size of amoebic liver abscesses and metastatic foci in hamsters. Infect. Immun. 31:571-573.

34.- Ghadirian, E., and Meerovitch, E. 1982. Macrophage requirement for host defense against experimental hepatic amebiasis in the hamster. Parasite. Immunol. 4:219-225.

35.- Ghadirian,E., Meerovitch,E., and Kongshhaun,P. 1983.
Role of macrophages in host defense against hepatic amoebiasis
in hamsters. Infect. Immun. 42:1017-1019.

36.- Meerovitch,E., and Ghadirian,E. 1980. Effect of
Trichinella spiralis infection on the experimental amebis liver
abscess in hamsters. Arch. Invest. Med. (Mex) 11 (Sup.1):185-188.

37.- Ganguly,N.K., Majahan,R.C., Sharma,S., Chandanani,R.E.,
Sharma,R., and Mohan,C. 1979. Isolation of antigen fraction
responsible for delayed hypersensitivity in amoebiasis. Indian. J.
Med. Res. 70:17-21.

38.- Harris,W.G., and Bray,R.S. 1976. Cellular sensitivity
in amoebiasis preliminary results of lymphocyte transformation
in response to antigen and to mitogen in carrier and disease
states. Trans. Loy. Soc. Trop. Med. Hyg. 70:340-343.

39.- Savanat,T., Viriyanond,P., and Nimitmongkol,N. 1973.
Blast. Transformation of lymphocytes in amoebiasis Am. J. Trop.
Med. Hyg. 22:705-710.

40.- Diamanstein,T., Klos,M., Gold,D., and Hahn,H. 1981.
Interactions between E. histolytica and the immune system. I.
Mitogenicity of E. histolytica extracts for human peripheral T
lymphocytes. J. Immunol. 126:2084-2086.

41.- Aust-Kettis,A., and Sundquist,K.G., 1982. Activation of lymphocytes from healthy donors and patients with amoebiasis by extracts of E. histolytica Arch. Invest. Med. (Mex), 13:245-248.

42.- Salata,R.A., and Ravdin,J.I. 1985. The N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of E. histolytica II. Mitogenic activity for human lymphocytes. J. Infect. Dis. 151:816-822.

43.- Diamond,L.S., Harlow,D.R., Curnick,C. 1978. A new medium for the axenic cultivation of E. histolytica and other Entamoeba Trans. R. Trop. Med. Hyg. 72(4):431-432.

44.- Beltrán,F., Biagi,F., Ortega,P.L. y Rivas,C. 1965. Observaciones sobre la reacción de inmunofluorescencia y la reacción de inmovilización de E. histolytica. Rev. Gastroenterol. Mex. 30:491-496.

45.- Brown,J.A. and Whitby,J.L. 1955. An immobilization test for amoebiasis. J. Clin. Path. 8:245-246.

46.- Yap,E.H., Aw, S.E. and Zaman,V. 1969. IgG as the main immobilization factor in rabbit antisera against Entamoeba. Experientia. 25:401-404.

47.- Boonpukcnaving, S. and Nairn, R.C. 1967. Serological diagnosis of amoebiasis by immunofluorescence. J. Clin. Path. 20:875-878.

48.- Calderón, J., Muñoz, M., Acosta, H.M. 1980. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in Entamoebae. J. Exp. Med. 151:184-193.

49.- Sepúlveda, B., Ortiz-Ortiz, L., Chévez, A., y Segura, M. 1974. Comprobación de la naturaleza inmunológica del efecto del suero y de la gammaglobulina inunes sobre el trofozoito de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex) 5:(Supl.1):343-346.

50.- Muñoz, M.L., Acosta del valle, H. y Calderón, J. 1978. Redistribución de antígenos superficiales de E. histolytica y su caracterización inmunoquímica. Arch. Invest. Med. (Mex) 9 (Supl.1):183-189.

51.- Parkhouse, M., Cid, M.E., and Calderón, J. 1978. Identificación de antígenos de membrana de E. histolytica con anticuerpos de pacientes con amibiasis. Arch. Invest. Med. (Mex) 9 (Supl.1):211-218.

52.- Serrano, R., Deas, J.E., and Warren, L.G. 1977. Entamoeba histolytica: membrane fractions. Exp. Parasitol. 41:348-370.

53.- Aley, S.R., Scott, W.A., and Cohn, J.A., 1980. Plasma membrane of E. histolytica. J. Exp. Med. 160-724.

54.- Aley, S.R., Cohn, J.A., and Scott, W.A., 1984. Endocytosis in E. histolytica evidence for a unique non-acidified compartment. J. Exp. Med. 160-724.

55.- Ramirez, R. María del Carmen, 1986. Tesis de licenciatura: Aislamiento, purificación parcial y caracterización de antígenos de complejos solubles de Entamoeba histolytica (HM1:1MSS).

56.- Torian, B.F., Lukehart, S.A. and Stamm, W.A., 1987. Use of monoclonal antibodies to identify, characterize and purify a 96000 dalton surface antigen of pathogenic E. histolytica. J. Infect. Dis. 156-334.

57.- Ortiz Ortiz, L., Ximenez, C., Mendoza, F. y Col. 1986. E. histolytica: Specific antigen recognized by monoclonal antibody. Exp. Parasitol. 61-390.

58.- Ravdin, J.L., Petri, W.A., Murphy, C.F. y Col. 1988. Production of mouse monoclonal antibodies which inhibit *in vitro* adherence of E. histolytica trophozoites. Infect. Immun. 142-147.

59.- Isibasi, A., Agundis, C. y Col. 1990. Obtención de anticuerpos monoclonales contra glicoproteínas de membranas externas de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex.) 21 (supl.):15-20.

60.- Walsh,A.J. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis., 8(2):228-238.

61.- Croos,G.A., 1975. Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei. Parasitol., 71:393-417.

62.- Lawson,E.Q., Hedlun,B.E., Ericson,M.E., Mood,D.A., Litman,G.W., and Middaugh,R., 1983. Effect of Carbohydrate on Protein Solubility. Arch. Biochem. Biophys., 220 (2):572-575.

63.- Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.L. y Col. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent J. Bio. Chem. 3,73.

64.- Garvey,J.S., Cremer,N.E., and Sussdorf,D.H., 1977. Methods in immunology. A laboratory Text for Instrucción and Research. 3a. ed. W.A. Benjamin, Inc., London; 7-38.

65.- Avrameas, S., Ternynck, T., 1971. Preparación del conjugado. Immunochemistry, 8, 1175.

66.- Meerovitch,E., Hartman,D.P., Ghadiriam,E., 1978. Protective inmunity and possible autoimmune regulations in amebiasis. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (supl. 1):247.

67.- Sepulveda,B., Arroyo,B.A., Tanimoto,W.M.,
Martinez,P.A., Ortiz-Ortiz,L., 1978. Inducción de inmunidad
protectora anti*Shistosoma* con "nuevos" antígenos en el hamster
lactante. Arch. Invest. Méd. (Méx) 9 (supl. 1):309,198.

68.- Portnoy,G.L., Oliva,A., Ramírez,J.A., Castellanos,C.,
del Muro,R., Ortiz-Ortiz,L., 1990. Un antígeno de *E. histolytica*
libre de actividad enzimática, pero dotado de propiedades
inmunológicas y protectoras. Arch. Invest. Méd. (Méx) 21
(supl.1):27.