

03062

12
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UACPyP/CCH.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

"CARACTERIZACION DE ANTIGENOS DE *Entamoeba histolytica*: FRECUENCIA DE REACTIVIDAD CON SALIVAS DE PACIENTES CON AMIBIASIS".

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

NANCY YORLEY / MORA PEREZ

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

A mis Padres.

Por enseñarme con su ejemplo, que la vida es una arcilla amorfa, que puedo moldear con mis manos. Que lo importante en la vida es descubrir dentro de mí las herramientas para cambiar la adversidad en bueno sin amarguras. Gracias a Dios por tenerlos.

Antonio:

Por tu cariño, tu paciencia y tu empeño para que yo saliera adelante, aun cuando tú tuvieras que sacrificar muchas cosas. Gracias mi amor.

Tu, Alberto y Esteban son el mayor motivo para estar feliz.

A mis Hermanos. Magaly, Gloria, Nubia, Carlos y Orlando.

A:

Julia Barcenas, Lourdes, Hector, Violeta, Angel y Gloria. Por hacerme sentir en familia. Su apoyo ha sido muy importante para mí.

A mis amigos:

Omaira, Jorge, Pabel, Julio César, María, Reina, Lucy, Ruben, Charly, Carmelo.

RECONOCIMIENTOS.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección y apoyo del Dr. Librado Ortiz y cotutoría de los doctores Enrique Ortega y Lino Díaz de León.

Por el apoyo técnico, al Biólogo José Antonio Ramírez, a la Ingeniero Tzipe Govezenski y al Biólogo Ángel Oliva.

Por la colaboración de dibujo y fotografía al Sr. José Aviles y Rafael Avila, del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A las secretarías del departamento de Inmunología: Isabel, Amada, Pelita y Violeta Aguilar.

A David Muñoz y Magdalena Corona de la sección de cómputo del IBB, por su colaboración.

CONTENIDO.

Resumen	3
Introducción	4
Taxonomía	5
Morfología	5
Ciclo de vida	6
Figura 1. Ciclo de vida	7
Patología	8
Epidemiología	9
Diagnóstico	10
Inmunidad	11
Inmunidad celular	11
Inmunidad humoral	12
Objetivos	16
Material y Métodos	17
Parásitos y antígenos	17
Antígeno total y membranal	17
Obtención de salivas	17
Electroforesis	18
Inmunolectrotransferencia	18
Análisis digital	19
Inmunoplot	19
Análisis discriminante	20
Resultados	21
Electroforesis de extractos de <i>Entamoeba histolytica</i>	21
Inmunolectrotransferencia de los extractos de <i>E. histolytica</i>	21
Figura 2. Análisis electroforético de extractos de <i>E. histolytica</i>	22
Figura 3. Patrones globales de reconocimiento de antígenos de <i>E. histolytica</i> digitalizados por el programa AMBIS	23
Análisis del extracto total	24
Análisis del extracto membranal	24

Figura 4. Patrón de reconocimiento de antígenos del extracto total de <i>E. histolytica</i> por inmunoelectrotransferencia	25
Figura 5. Patrón de reconocimiento de antígenos del extracto membranal de <i>E. histolytica</i> por inmunoelectrotransferencia	26
Tabla 1. Datos de frecuencia e intensidad de reconocimiento de antígenos del extracto total de <i>E. histolytica</i>	27
Tabla 2. Datos de frecuencia e intensidad de reconocimiento de antígenos del extracto membranal de <i>E. histolytica</i>	28
Análisis de inmunoplot del extracto total de <i>E. histolytica</i>	29
Análisis de inmunoplot del extracto membranal de <i>E. histolytica</i>	30
Análisis discriminante	30
Fig 6. Inmunoplot de la frecuencia y la intensidad de reconocimiento de antígenos del extracto total de <i>E. histolytica</i> (Puebla)	31
Fig 7. Inmunoplot de la frecuencia y la intensidad de reconocimiento de antígenos del extracto total de <i>E. histolytica</i> (Distrito Federal)	32
Fig 8. Inmunoplot de la frecuencia y la intensidad de reconocimiento de antígenos del extracto membranal de <i>E. histolytica</i> (Puebla)	33
Fig 9. Inmunoplot de la frecuencia y la intensidad de reconocimiento de antígenos del extracto membranal de <i>E. histolytica</i> (Distrito Federal)	34
Tabla 3 y 4. Análisis discriminante usando antígenos del extracto total y membranal respectivamente de <i>E. histolytica</i>	35
Discusión	36
Conclusiones	43
Bibliografía	45

RESUMEN.

En el presente trabajo se analizaron los perfiles de reconocimiento de las salivas de pacientes con amibiasis intestinal en contra de antígenos de *Entamoeba histolytica*. Asimismo estos patrones se compararon con aquellos que se presentan cuando se utilizan muestras de saliva de individuos sanos. Los resultados obtenidos indican que existe una gran heterogeneidad de patrones de reconocimiento en ambas poblaciones de individuos. Mediante el análisis de inmunoplot fue posible determinar una serie de bandas proteicas, las cuales fueron reconocidas en un alto porcentaje, por las muestras de salivas de individuos con amibiasis. La aplicación de un análisis discriminante a estos componentes permitieron diferenciar con un 85% de sensibilidad a los pacientes de individuos sanos, sin embargo este no descartó la presencia de individuos asintomáticos en la población sana, ni la posible invasión por cepas no patógenas.

INTRODUCCION.

La amibiasis es una enfermedad producida por el protozooario denominado *E. histolytica* y es considerada como un problema de salud pública que ha estimulado la formación de diversos grupos de investigación dedicados al estudio de este parásito. Esto ultimo ha favorecido la generación de un conocimiento más amplio de los mecanismos de la relación huésped-parásito. Esta enfermedad es cosmopolita y se presenta con mayor frecuencia en países subdesarrollados, en los que no existen programas de salud enfocados a la educación higiénica y/o prevención de las enfermedades infecto-contagiosas, hecho que a últimas fechas ha dado lugar a un aumento considerable de este padecimiento. Este es el caso de la República Mexicana en la que se ha detectado este protozooario en todos los estratos sociales (Caballero y col, 1994). Existen a nivel mundial alrededor de 500 millones de personas con amibiasis, sin tomar en consideración a la República de China (Walsh, 1986), y se ha reportado que anualmente mueren entre 50,000 y 110,000 pacientes por complicaciones intestinales o extraintestinales (Martínez-Palomo y col, 1982). Se han logrado avances considerables en el conocimiento de la biología de *E. histolytica*, principalmente sobre los mecanismos mediante los cuales se presenta la enfermedad (Krogstad y col, 1978), así como de la respuesta inmune del hospedero para eliminar al parásito y también acerca del tratamiento de este padecimiento (Gillin y Diamond, 1981). Sin embargo, en México, hasta la fecha no se han podido desarrollar e implementar medidas que conduzcan al control y/o prevención de la enfermedad.

El cultivo axénico de este protozooario, desarrollado por Diamond (1961), ha permitido obtener grandes cantidades del parásito. De esta manera se ha podido estudiar más ampliamente a través de la aplicación de varios métodos como la electroforesis e inmunotransferencia, así como la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales. Esta última ha sido usada principalmente para la caracterización del mosaico antigénico de este protozooario y para el diagnóstico

de la enfermedad mediante el desarrollo de pruebas más sensibles, específicas y más confiables que el examen coproparasitológico hasta ahora usado con este fin. Tal es el caso de las pruebas diagnósticas basadas en la detección de antígenos ambientales en heces, empleando estos reactivos monoclonales (Merino y col, 1990).

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y MORFOLOGÍA.

Entamoeba histolytica (Zaman-Vigar, 1979)

Phylum: Protozoa

Subphylum: Sarcomastigophora

Superclase: Sarcodina

Clase: Rhizopodea

Familia: Entamoebidae

Género: *Entamoeba*

Especie: *histolytica*.

Durante su ciclo biológico, este parásito presenta tres formas que son: trofozoito, pre-quiste y quiste. El trofozoito, de forma variable es móvil e invasivo, y mide entre 15 y 60 μm de diámetro, se mueve mediante la emisión de proyecciones citoplásmicas llamadas pseudópodos. Este organismo posee un núcleo organizado, con cromatina periférica fina y nucleólo central; carece de mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y lisosomas. Posee un ectoplasma y endoplasma granular con numerosas vacuolas (Martínez-Palomo, 1987). Su superficie está constituida por una membrana plásmica constituida por proteínas y carbohidratos. En el trofozoito puede diferenciarse una parte posterior, denominada uroide donde se concentran vesículas que descargan su contenido al exterior (Pittman y col, 1973); este estadio del parásito presenta además una gran cantidad de enzimas, con las cuales se ha establecido un patrón de tipo isoenzimático, que ha servido para clasificar en cepas patógenas y no patógenas de este organismo (Sargeant y col, 1978).

Más recientemente mediante el uso de técnicas de biología molecular, en el campo de la amibiasis, se han reportando diferencias importantes en varios genes lo cual a llevado ha proponer la existencia de dos especies, una no patógena denominada *E. dispar* y una patógena descrita como *E. histolytica* (Diamond y Clark, 1993). Apoyando esta idea, se han reportado diferencias en las secuencias genómicas específicas, en clonas obtenidas en librerías de cDNA de ambas amibas (Tannich y Burchard 1991). Por otra parte, otras sondas derivadas de secuencias repetitivas han sido útiles para diferenciar entre aislados patógenos y no patógenos (Burch y cols, 1991; Cruz Reyes y Ackers , 1992).

Cuando las condiciones ambientales en el intestino grueso se vuelven adversas para el trofozoito, este se inmoviliza, pierde su material citoplásmico, y adquiere una forma redonda e inicia la síntesis de una membrana doble y gruesa que rodea a todo el organismo (pared quística) Esta pared le confiere protección cuando es expulsado al exterior con la materia fecal. La forma considerada como infectante y de resistencia de *E. histolytica* se llama quiste mide un promedio de 12 μm de diámetro. Dependiendo del estado de madurez presenta de 1 a 4 núcleos (Smith y col, 1979). Su núcleo y citoplasma son iguales al del trofozoito pero a diferencia, el quiste no invade el tejido y su presencia en heces frescas es un indicador de la magnitud de la infección ya que se ha establecido que un individuo infectado llega a excretar alrededor de 45 millones de quistes por día.

CICLO DE VIDA (fig. 1).

El ciclo de vida se inicia con la ingestión de los quistes presentes en el agua o alimentos contaminados con materia fecal, los cuales en su paso por el estómago resisten la acción de los jugos gástricos y pasan al intestino delgado. Una vez que los quistes pierden su cubierta de quitina por efecto de las enzimas contenidas en el jugo intestinal, dan lugar a un trofozoito octanucleado; de este trofozoito se forman ocho de tipo metaquisticos los cuales que se dividen por fisión binaria, se adhieren a la mucosa intestinal , se reproducen en forma más activa, y colonizan

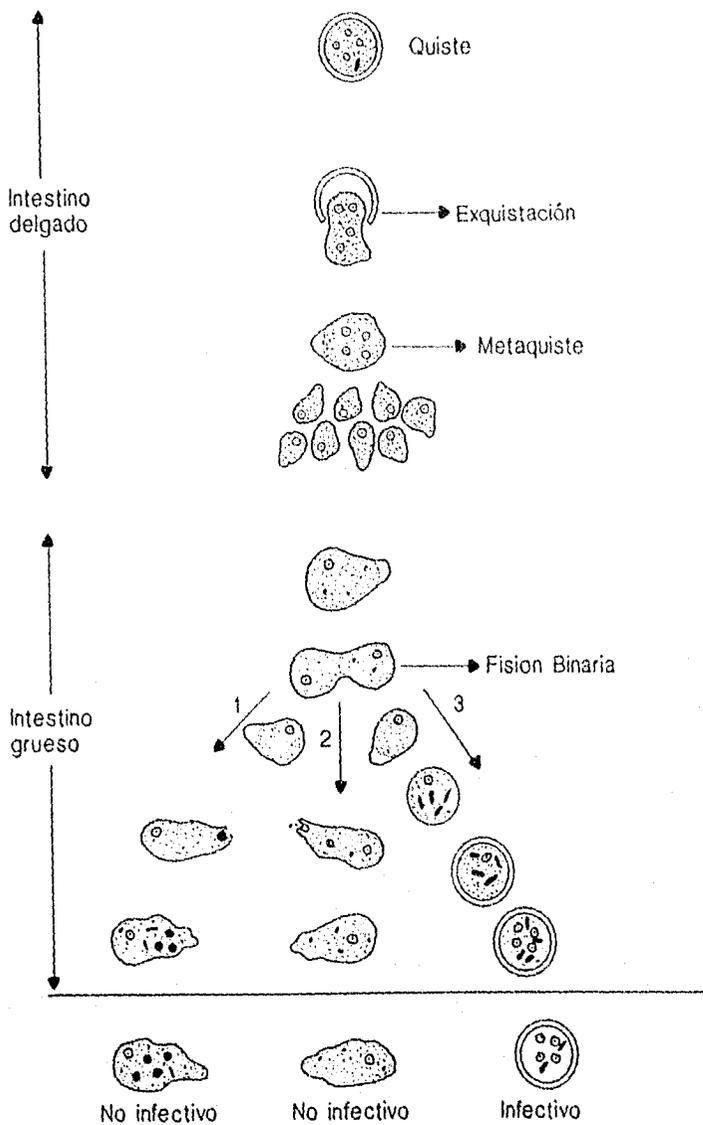


FIG. 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.

la mucosa intestinal, principalmente a nivel del intestino grueso (Kretschmer 1984). En algunos casos y dependiendo de varios factores como el número de trofozoitos y sus características patogénicas, del tránsito intestinal, del potencial de oxidación-reducción, del microambiente, los parásitos pueden emigrar por vía porta e instalarse en diferentes órganos, como el hígado, pulmón, cerebro y piel. Cuando las condiciones del microambiente del intestino varían, el trofozoito se enquista y posteriormente es expulsado en las heces, completándose de esta forma el ciclo de vida (Fig. 1). El período de incubación de la enfermedad es de 1 a 5 días, la sintomatología se presenta entre 4 días a 8 días y raramente de los 6 meses a un año, con un promedio aproximado de 4 meses (Jalan y Maitra, 1988), considerándose al hombre como el reservorio más importante de *E. Histolytica* (Elsdon-Dew, 1968).

PATOLOGÍA.

La patogénesis puede ser definida como el origen y desarrollo de la enfermedad (Ravdin, 1986). Los mecanismos de la patogénesis en amebiasis han sido resumidos como sigue:

- 1). Colonización del intestino por parte de amebas patógenas.
- 2). Rompimiento de las barreras de la mucosa intestinal, mediante enzimas y productos tóxicos, involucrando un mecanismo de contacto íntimo o adherencia a la mucosa intestinal.
- 3). Lisis de las células intestinales con interrupción de la mucosa, úlceras colónicas y destrucción de tejido.
- 4). Resistencia a los mecanismos de defensa humoral y celular .
- 5) La invasión a otros órganos distantes, especialmente el hígado dando a una serie de alteraciones y complicaciones de otro tipo.

La forma intestinal de tipo asintomática, se presenta cuando la amiba vive como comensal, se nutre reproduce y forma quistes, los cuales son expulsados con la materia fecal. El comportamiento de la amiba en el hombre es impredecible ya que mientras ciertos individuos dentro de una población pueden desarrollar amibiasis invasora, en otros aún cuando están en contacto con la misma población y/o misma cepa de amibas no la presentan. Sin embargo, la amibiasis invasora puede desarrollarse en cualquier momento (Ruiz-Palacios y col, 1992), lo que implica que la *E. histolytica* es potencialmente patogénica, solo que sus manifestaciones se presentan bajo ciertas condiciones (Ravdin y col, 1980). Asimismo se tiene que considerar la existencia de la *E. dispar* como una forma comensal, por lo que las personas que desarrollan la enfermedad pudieran tener poblaciones mixtas de ambas especies de amibas.

EPIDEMIOLOGÍA.

La propagación de esta enfermedad esta relacionada con la higiene, el hacinamiento, la contaminación del agua y alimentos, educación higiénica así como la eliminación inadecuada de la materia fecal. Todos estos factores están asociados a las condiciones socioeconómicas de la región en estudio (Gutierrez, y col, 1976). En estudios realizados en México se observó una mayor incidencia de portadores de quistes en la periferia de la ciudad, en donde se determinó que las condiciones de las viviendas son precarias y que dicho estado disminuye a medida que se mejora la calidad sanitaria de las mismas (Harries, 1982). En el mismo sentido la frecuencia de portadores aumenta en aquellas instituciones dedicadas a incapacitados mentales (Sexton y col 1974), en personas de edad avanzada (González-Montesinos y col, 1971), en niños y en homosexuales (Arroyave y col 1990).

Se han llevado a cabo estudios de tipo seroepidemiológico a fin de determinar la infección con *E. histolytica*. En un estudio realizado en el año de 1972 por Landa y Col (1972), en una población de adultos del Distrito Federal y mediante el

uso de la prueba de contrainmunolectroforésis se encontró una seroprevalencia de 5 a 6%. En otro estudio en el que se utilizó el suero de 776 niños de la ciudad de México se reportó una seropositividad de 3.9% (Gutiérrez y col 1974) y en el de adultos de un 6.6% (Crevenna, 1977).

En 1974 se hizo una encuesta seroepidemiológica con sueros de 19,442 individuos representativos de 46 regiones de la República Mexicana, encontrándose un promedio de seropositividad de 5.95% (Gutiérrez, 1986). En un trabajo reciente realizado por Caballero y col (1994), se analizaron por hemaglutinación indirecta 70,000 sueros, resultando una seroprevalencia del 8.41%. Estos hallazgos demuestran el carácter endémico de la amibiasis intestinal, sin embargo, gracias a los métodos de diagnóstico y tratamiento, se ha observado que el absceso hepático amibiano (AHA) en adultos, ha disminuido del 2% al 0.2% y en niños de 26.9 a 1.1% entre 1976 y 1985 (Gutiérrez y col, 1986).

DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de la amibiasis se fundamenta en la identificación de quistes y trofozoítos de amibas en las muestras de heces. La detección de anticuerpos anti-amiba en muestras de suero, ha sido de ayuda diagnóstica sobre todo en el caso de absceso hepático amibiano. Para la detección de estos anticuerpos se han utilizado técnicas como: Hemaglutinación indirecta (HAI) contrainmunolectroforésis y ELISA (del inglés enzymed linked-immunosorbent assay). También se han detectado mediante el uso de anticuerpos monoclonales antígenos amibianos en heces. Mas recientemente las técnicas de Biología Molecular como el PCR están siendo empleadas en el diagnóstico de la amibiasis, usando sondas específicas derivadas de amibas con zimodemos marcadores de patogenicidad (Tachibana y col 1991).

INMUNIDAD.

El establecimiento de la enfermedad involucra diferentes factores tanto del hospedero como de la amiba; del primero, se ha considerado la susceptibilidad, el estado nutricional, la microflora intestinal y el potencial redox (Brown, 1970), por parte de la amiba, los mecanismos propios que utiliza para atacar la mucosa intestinal considerada como la primera barrera de defensa contra el parásito. Al ocurrir esta serie de eventos, entran en juego por parte del hospedero una serie de mecanismos humorales y celulares que son relevantes en la resistencia a la infección.

Inmunidad Celular.

El papel de la inmunidad mediada por células en *E. histolytica* ha sido estudiada en humanos y en animales de experimentación. El estudio de las fases tempranas de la enfermedad revelan que el primer fenómeno que se presenta es una reacción inflamatoria aguda rica en leucocitos, con una posterior predominancia de mononucleares; esta reacción puede verse enmascarada por la destrucción del tejido inflamatorio por parte de la amiba (Kretschmer y col, 1990). En los estadios tempranos, el fenómeno de inflamación puede degenerar a la ulceración y como consecuencia necrosis del tejido, con infiltración de neutrófilos por debajo de la lámina propia, y la presencia de pequeñas zonas en las cuales se pierde la continuidad de la mucosa (Harries, 1982). La reacción inflamatoria se acentúa debido a la presencia de células cebadas y mononucleares, y la infiltración de fluido tisular (Miller, 1980). Los macrófagos presentes en este proceso, al parecer se distribuyen en la periferia de la lesión, fagocitando restos celulares y al interactuar con la amiba son destruidos, dando lugar a una severa lisis de las células inflamatorias. Este fenómeno ha sido ampliamente observado y descrito en la formación de abscesos con destrucción del tejido hepático. (Tsumumi y col, 1984). Sin embargo, la amiba no es destruida y continúa con su actividad invasiva, y para lograrlo inhibe el estallido respiratorio de los macrófagos (Arbo y col 1990), suprimiendo, con ello la respuesta inmunitaria

mediada por células (Salata y col,1990). Además se altera la respuesta proliferativa de linfocitos CD4 y CD8 a los antígenos del parásito. Asimismo, se ha reportado efecto de algunas proteínas amebianas localizadas en la superficie del parásito o bien secretadas por este, que han sido consideradas como las responsables de la disfunción inmunitaria (Denis y Chadee 1988). Sin embargo y en forma contradictoria, se han realizado experimentos en los que se han inmunizado animales de experimentación con proteínas totales del parásito, observándose cierto grado de protección cuando los animales son desafiados intrahepáticamente con trofozoitos virulentos de *E. histolytica*. Por otro lado, se ha observado in vitro, la lisis del parásito cuando interacciona con linfocitos provenientes de pacientes que se han recuperado de un absceso hepático amebiano. Estas observaciones han permitido establecer la importancia que representa la inmunidad mediada por células en este tipo de parasitosis (Landa y col 1976).

Inmunidad humoral.

El curso de la respuesta inmune en la amebiasis intestinal se ha caracterizado por una respuesta local transitoria de tipo secretora, dada, principalmente por el fenómeno de la adherencia, colonización y en ciertos casos la penetración de las amebas virulentas a la mucosa intestinal su migración a otros órganos con la subsecuente producción de anticuerpos a este nivel (Trissl, 1982). No se ha establecido con certeza el tiempo que transcurre entre la infección con la *E. histolytica* y la aparición de una respuesta local de anticuerpos. Se ha observado la presencia de coproanticuerpos de la clase IgA e IgG en el 80 % de los pacientes con disentería amebiana (Martínez-Cairo y col, 1979), cuyos títulos disminuyen después de 3 semanas hasta un 55%; por otra parte, se ha determinado que los anticuerpos séricos se incrementan significativamente, sin embargo, los títulos no correlacionan con la severidad de la enfermedad. Esto se ha observado de igual manera en individuos con antecedentes de absceso hepático amebiano, donde los títulos de anticuerpos permanecen elevados por un

largo periodo aún después de curado el padecimiento (Knobloch y Mannweiler, 1983). Este fenómeno se ha tratado de explicar por la persistencia de antígeno amibiano secuestrado en el sistema reticuloendotelial y por la presencia de las inmunoglobulinas que se encuentran en mayor proporción en la amibiasis invasora. Estas últimas de la clase IgM que se presenta en un contacto inicial con el parásito, la IgG y de la cual predomina la subclase IgG2 (Arellano y Ortiz-Ortiz, 1974). En el caso de la IgA esta ha sido encontrada en materia fecal (Coproanticuerpos), en la leche humana (Grundy y col, 1983), calostro (Acosta y col 1985, Berber y col 1990) y en salivas (del Muro y col, 1990) como indicativo de una estimulación local a nivel del intestino; además se han reportado anticuerpos séricos de esta clase de inmunoglobulina en individuos que cursan con una amibiasis intestinal (O'Shea-Alvarez y Treviño, 1985). Este tipo de respuesta ha sido utilizado para la caracterización de la inmunidad inducida por los antígenos amibianos, con dos aplicaciones prácticas; en estudios de tipo seroepidemiológico de la infección, y otra en el diagnóstico de la enfermedad.

México ha sido considerado como una zona altamente endémica en la que se ha observado la presencia de anticuerpos anti-*E.histolytica* presentes en personas de todas las edades. Así el diagnóstico de la enfermedad, a través de la detección de anticuerpos, se basa en este hecho ya que tales anticuerpos son encontrados en el 90% de los pacientes con AHA o amibiasis de tipo invasora y solo se encuentran en un pequeño porcentaje de la población sin evidencia clínica. Por otra parte en portadores asintomáticos alcanza un 6.6%, y su presencia persiste después de que se ha curado el padecimiento y probablemente en aquellas infecciones consideradas como subclínicas.

Sin embargo, tal y como sucede en otras infecciones intestinales, la secreción de IgA, puede influir en la inmunidad a nivel local contra *E. histolytica*. Esta inmunoglobulina inhibe la absorción de antígenos y cumple una función local en la defensa contra enterobacterias particularmente *Vibrium cholerae*, así como

virus y antígenos alimentarios (Bienenstock y Befus 1985). La aglutinación de bacterias y otros antígenos extraños por la IgA impide su adherencia a células epiteliales inhibiendo con ello la colonización de la mucosa. También puede retener al microorganismo en la capa de moco, evitando con ello su movilidad así como la penetración a las capas más profundas del intestino (Tse y Chadee, 1991).

En términos generales, el papel de la IgA en la protección no ha quedado debidamente esclarecido, sin embargo, diversos estudios *in vitro* han demostrado que la IgA anti-amibiana presente en la saliva de pacientes con amibiasis intestinal inhibe la adherencia de trofozoítos a células MDCK en más de un 20% en promedio, mientras que la no específica lo hace por abajo del 13% (Carrero y col 1994).

La saliva de individuos ha sido utilizada para probar la presencia de anticuerpos contra diferentes organismos (Viničius-da Silva y col, 1992; Katz, 1993), así como la presencia de IgA contra HIV (Zhang y col, 1992). El uso de la IgA contenida en la saliva de individuos también ha sido propuesta para ser usada en métodos de inmunodiagnóstico de la amibiasis, obteniendo resultados con sensibilidades y especificidades altas en niños en edad escolar (del Muro y col, 1990), o bien en pacientes con absceso hepático amibiano (Ketsall y col, 1994).

Por lo anterior y tomando en cuenta la posible importancia de los anticuerpos de la clase IgA anti-amiba como probables agentes protectores de la amibiasis intestinal es necesario evaluar la respuesta inmune de tipo secretoria que se induce hacia los componentes inmunogénicos de la amiba en pacientes con amibiasis intestinal y en forma comparativa con la de individuos sanos de algunas zonas consideradas como endémicas.

De acuerdo a este panorama, los datos obtenidos en este trabajo podrían aportar conocimientos acerca de los antígenos de *E. histolytica*, que son reconocidos

por los anticuerpos contenidos en las muestras de saliva de individuos con amibiasis intestinal. De esta manera se podría contribuir a un mejor entendimiento de la respuesta inmune generada durante la infección con este parásito. Asimismo sería posible proponer el desarrollo de métodos de diagnóstico más específicos y sensibles para la detección de la amibiasis intestinal.

Objetivo general: Estudiar la respuesta de anticuerpos de la clase IgA empleando muestras de salivas de pacientes con amibiasis intestinal y/o individuos sanos.

Objetivos particulares:

1. Caracterizar el perfil proteico de extractos totales y membranales de *E. histolytica*.
2. Identificar los antígenos de *E. histolytica* más relevantes en los extractos totales y membranales, que son reconocidos por las muestras de salivas de pacientes.
3. Analizar la frecuencia de reactividad de anticuepos presentes en las muestras de salivas de pacientes con amibiasis intestinal y la de individuos sanos, contra antígenos totales y membranales de *E. histolytica*.

MATERIAL Y METODOS.

Parásitos y antígenos.

Los parásitos se obtuvieron a partir de cultivos axénicos de *E. histolytica* de la cepa HMI-IMSS en medio TYI-S-33 con 15% de suero bovino de acuerdo al procedimiento de Diamond, 1961.

Antígeno Total.

Para la preparación de extracto total de amiba, los trofozoitos de *E. histolytica*, se colectaron de las botellas de cultivo a las 72 h, por enfriamiento de éstas en un baño de hielo por 10 min y mediante centrifugación a 100 xg por 10 min. Enseguida se lavaron con amortiguador fosfato salino (PBS) tres veces. El sedimento final se resuspendió en amortiguador glicina-HCl pH 2 y se sometió a 5 ciclos de congelación y descongelación; finalmente se almacenó a -70 ° hasta ser utilizado.

Antígeno Membranal.

El antígeno de membrana se obtuvo por el método de Thomas (1990). En este caso, las amibas se lavaron como se describió anteriormente se resuspendieron en 50 volúmenes de sacarosa EDTA-1mM, EGTA-5mM, con Chaps (3-3 Cholanidopropyl-dimetil amonio-1-propano sulfonato) al 0.5% y las células se rompieron en un homogenizador con émbolo de teflón aplicando 120 golpes. A continuación se centrifugaron a 200 x g por 10 min, se colectó el sobrenadante y se centrifugó a 8,000 x g por 1 hr a 4° C; el precipitado se resuspendió en glicina-HCl pH 2 y se almacenó a -70 ° C, hasta su utilización. La cuantificación proteica de los extractos se realizó por el método de Lowry y col (1951).

Obtención de Salivas.

Las muestras de saliva se colectaron de 48 pacientes de dos localidades, 25 del Distrito Federal proporcionadas por el Dr. Edmundo Godínez del Servicio de Gastroenterología del Hospital General de México y obtenidas de individuos con

diagnóstico de amibiasis intestinal confirmadas por rectosigmoidoscopia, y examen coproparasitológico; 23 muestras fueron enviadas de la ciudad de Puebla, para su estudio debido a que estos individuos presentaban síntomas clínicos característicos de amibiasis. A todas las muestras de saliva se les determinó la presencia de anticuerpos anti-amiba por el ensayo de ELISA (Voller y col, 1978). Los individuos sanos se seleccionaron al azar de aquellos que no presentaban ninguna manifestación clínica y con resultados negativos por examen coproparasitológico. Las muestras de saliva se centrifugaron 30 min a 300 x g y el sobrenadante se almacenó a -20° C, hasta ser utilizado.

Electroforésis.

Los antígenos total y de membrana obtenidos por los métodos antes descritos, se analizaron por electroforésis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS duodecilsulfato de sodio (EGPA-DSS), de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Las muestras se ajustaron a una concentración de 100 µg por gel preparativo en solución de muestra, usando como agente reductor 2-mercaptoetanol al 5 %, se hirvieron por 3 minutos en baño de María, después de lo cual se colocaron en el carril del gel. La electroforésis se llevo a cabo durante 18 h, con una corriente constante de 75 vol y se detuvo cuando el colorante llegó a 0.5 cm del final del gel. Se cortó una pequeña parte del gel y se tiñó con azul de Coomasie y el resto se transfirió a papel de nitrocelulosa para el ensayo de inmunoelectrotransferencia.

Inmunoelectrotransferencia.

Los geles preparativos conteniendo las proteínas de *E. histolytica* procesadas en la electroforésis se transfirieron a papel de nitrocelulosa de acuerdo al método de Towbin y col (1979). Brevemente, después de la electroforésis los geles se sumergieron en amortiguador de transferencia, durante 1 hr. La transferencia se realizó durante 1 hr 24 V, en la misma solución. A continuación y para comprobar que la transferencia se había realizado en óptimas condiciones, se cortó una tira

de papel de nitrocelulosa y se sumergió en una solución acuosa de negro de amido al 0.001% en metanol al 10% , ácido acético al 5%. Posteriormente se eliminó el exceso de colorante mediante lavados con agua desionizada. El resto del papel se bloqueó con una solución de PBS-tween 20 + 0.3%; albúmina sérica bovina 1.5%, toda la noche a 4° C. Una vez bloqueado el papel se lavó cuatro veces 10 min cada vez con PBS-Tween 0.3% (AT) y se cortó en tiras de tres mm de ancho, para ser incubadas toda la noche a 4° C, con muestras de saliva de los individuos de este estudio, las cuales se incubaron a 4 °C. Después las tiras se lavaron con AT 3 veces de 10 minutos cada vez y se adicionó anti-IgA humana (contra cadena alfa), preparada en cabra y acoplado a la enzima peroxidasa, incubándose 6 horas a temperatura ambiente. El desarrollo de color se obtuvo lavando las tiras como se mencionó anteriormente y colocando la solución reveladora de orto-cloro naftol 0.05%.

Análisis digital.

Con fin de estandarizar el tamaño de todas las tiras y obtener un patrón de reconocimiento, las bandas obtenidas en la inmunoelectrotransferencia fueron digitalizadas y analizadas individualmente, mediante el programa computarizado AMBIS. En el caso de bandas muy cercanas (0.5 mm en la tira original) se tomó a las dos como una sola; con la finalidad de simplificar el análisis de los patrones de reconocimiento. Con tales patrones, se hizo una cuantificación a nivel individual de cada una de las bandas reconocidas, utilizando este programa. A partir de los datos obtenidos se realizó un análisis discriminante utilizando las bandas reconocidas con mayor frecuencia.

Inmunoplot.

El inmunoplot (Larralde y col 1989), representa la frecuencia con la cual cada fracción antigénica de *E. histolytica*, reacciona con las muestras de saliva de individuos infectados. A partir de los resultados obtenidos en el ensayo de inmunoelectrotransferencia, los datos se grafican contra la frecuencia con la cual

la misma fracción antigénica reacciona con muestras de saliva de individuos sanos. El valor de la frecuencia para cada banda se obtuvo, tomando como referencia un patrón debidamente estandarizado y que presentaba la mayoría de las bandas antigénicas reconocidas y ordenadas en función de su peso molecular (PM).

Análisis discriminante.

Para el análisis discriminante, se seleccionaron 6 antígenos, cuya frecuencia de reconocimiento por los pacientes con amibiasis intestinal, era mayor del 50%. Estos antígenos fueron seleccionados del inmunoplot y analizados a través de un estudio de regresión logística para buscar antígenos discriminantes de pacientes con amibiasis intestinal utilizando el programa BMDP statistical software (Krizamosofki 1990).

RESULTADOS.

Electroforésis de los extractos de *E. histolytica*.

Los patrones obtenidos con los dos extractos amibianos totales y de membrana, separados en geles de poliacrilamida muestran una gran complejidad. Cuando se compararon ambos extractos, se observaron diferencias en cuanto al número de componentes y la cantidad relativa de cada uno de estos en los diferentes extractos (Fig. 2). En la electroforésis del extracto total se visualizaron 42 componentes que variaban de 10 a 270 KDa. Por su parte en el extracto membranal se pudieron visualizar aproximadamente 40 bandas proteicas que van de 10 a 230 KDa. Cuando se utilizó el programa AMBIS se detectaron 34 proteínas en el extracto total y 33 en el membranal (Fig. 3). A partir de estos datos se realizó el análisis de inmunoplot.

Inmunoelectrotransferencia de los extractos de *E. histolytica*.

Al hacer la comparación de la reactividad de las muestras de salivas de las diferentes poblaciones estudiadas, se observaron diferencias cuantitativas en su reconocimiento. Las salivas provenientes de individuos originarios de la ciudad de Puebla, reconocieron los mismos antígenos que las de los pacientes del Distrito Federal, sin embargo, éstos últimos lo hicieron con intensidades menores, variando con esto la proporción de salivas que reconocían un antígeno determinado (Fig. 4 y 5). Es necesario mencionar que el tiempo de almacenamiento en congelación de las muestras, fue diferente, siendo menor en las de Puebla. Debido a que en ambas poblaciones se encontraron los mismos antígenos reconocidos, el análisis general se realizó sobre los resultados obtenidos en esta última localidad (Puebla, Pue.).

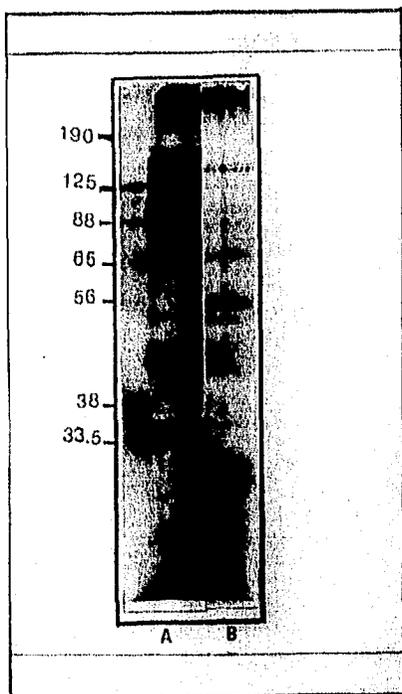


FIG. 2. Análisis electroforético de las proteínas de membrana (A) y totales (B) de *E. histolytica*. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y 5% de β -mercaptoetanol. La corrida se realizó durante 12 horas a 60 volts. Los pesos moleculares de las proteínas utilizadas como marcadores se muestran en KDa a la izquierda de la figura.

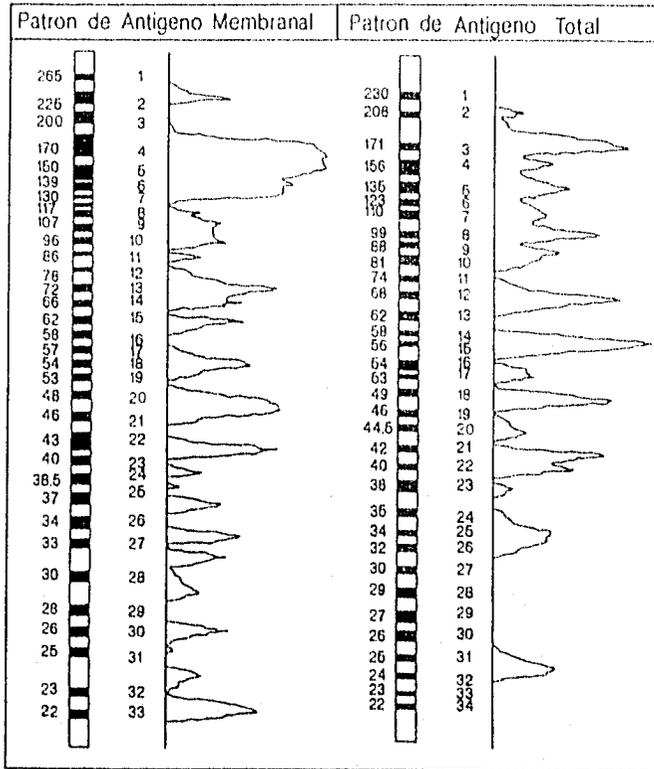


FIG. 3. Patrones globales de reconocimiento de los antígenos de *Entamoeba histolytica*, obtenidos mediante el programa de análisis digital AMBIS. El patron de reconocimiento de bandas (izquierda), se elaboró tomando en cuenta el mayor número de bandas reconocidas por la saliva de todos los individuos analizados en este estudio. La grafica (derecha de cada patron), muestra el análisis densitométrico de cada componente.

ANALISIS DEL EXTRACTO TOTAL.

En virtud de la gran heterogeneidad que se distingue en ambos extractos (total y de membrana) y usando tanto muestras de saliva de pacientes con la enfermedad así como de individuos normales, se hizo necesaria la caracterización de 4 diferentes patrones de reconocimiento al utilizar el extracto completo de ambas (Fig. 4), los cuales fueron definidos de la siguiente manera:

Patrón 1, reconocimiento intenso de componentes que van de los 14 a los 260 KDa.

Patrón 2. La reactividad se localiza principalmente por arriba de los 50 KDa con un reconocimiento tenue en aquellas proteínas de menor peso molecular.

Patrón 3. Un reconocimiento tenue a lo largo del papel de nitrocelulosa.

Patrón 4. Sin reactividad.

ANALISIS DEL EXTRACTO MEMBRANAL.

Cuando se analizó la reactividad de las salivas de pacientes con el extracto membranar también se observaron diferencias en el patrón de reconocimiento (Fig. 5), por lo que, de igual forma se definieron como sigue:

Patrón 1, Reconocimiento intenso en un rango 18 a 260 KDa aproximadamente.

Patrón 2, Reconocimiento intenso de las proteínas de aproximadamente 42 y 47 KDa de peso molecular, y uno de forma tenue de diversos componentes a lo largo del papel de nitrocelulosa.

Patrón 3, reconocimiento tenue de la banda de 33 KDa y muy tenue de otros componentes de mayor peso molecular.

Patrón 4. Sin reactividad.

Antígeno Membranal

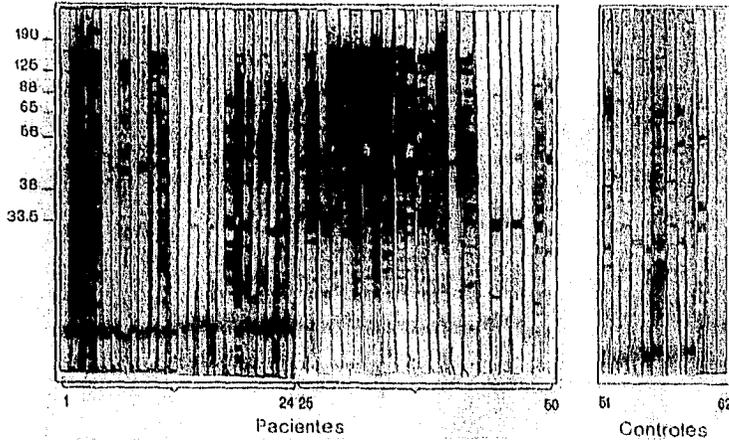


FIG. 5. Patrón de reconocimiento de antígenos de *E. histolytica* (extracto membranar) por salivas de pacientes de Distrito Federal (carriles 1-24), Puebla (carriles 25-50) e individuos sanos (carriles 51-62). Cada tira de nitrocelulosa se incubó con la muestra de saliva de pacientes e individuos sanos. Posteriormente se utilizó un anticuerpo anti-IgA humana realizado en cabra acoplado a peroxidasa y se reveló con o-cloronaftol. El peso molecular de las proteínas utilizadas como marcador se muestran en kDa a la izquierda de la figura

Antígenos totales

PM	Controles		Pacientes	
	Frecuencia	Intensidad	Frecuencia	Intensidad
230	26.67%	440.5	0.00%	0.0
208	6.67%	439.0	0.00%	0.0
171	20.00%	313.7	13.04%	214.3
156	26.67%	142.0	21.74%	764.0
135	60.00%	1449.4	47.83%	562.7
123	26.67%	491.0	60.87%	1225.0
110	0.00%	0.0	39.13%	873.6
99	53.33%	500.1	43.48%	529.2
88	46.67%	226.7	69.57%	937.1
81	13.33%	119.0	43.48%	815.9
74	6.67%	111.0	47.83%	992.7
68	13.33%	1351.0	52.17%	1007.0
62	13.33%	454.0	56.52%	563.4
58	0.00%	0.0	30.43%	769.0
56	33.33%	760.2	26.09%	252.8
54	33.33%	820.8	30.43%	857.3
53	13.33%	256.0	13.04%	91.7
49	20.00%	604.7	56.52%	1595.8
46	0.00%	0.0	56.52%	466.1
44.5	6.67%	10.0	21.74%	164.6
42	0.00%	0.0	34.78%	660.6
40	6.67%	461.0	47.83%	813.5
38	6.67%	172.0	34.78%	441.6
35	6.67%	355.0	26.09%	335.2
34	13.33%	110.0	30.43%	288.6
32	20.00%	479.0	8.70%	340.0
30	6.67%	257.0	43.48%	503.9
29	13.33%	258.5	60.87%	729.3
27	0.00%	0.0	17.39%	394.0
26	0.00%	0.0	26.09%	1508.7
25	0.00%	0.0	21.74%	433.2
24	6.67%	327.0	26.09%	237.8
23	13.33%	389.0	47.83%	816.2
22	13.33%	640.0	4.35%	118.0

TABLA NO. 1. Datos de frecuencia (%) e intensidad (D.O.), obtenidos a partir de las imágenes digitalizadas de los patrones de reconocimiento de antígenos totales de *E. histolytica* por muestras de saliva de pacientes e individuos sanos.

Antígenos de membrana

PM	Controles		Pacientes	
	Frecuencia	Intensidad	Frecuencia	Intensidad
265	0.00%	0.0	0.00%	0.0
225	0.00%	0.0	8.70%	257.0
200	0.00%	0.0	0.00%	0.0
170	28.57%	1078.8	69.57%	2486.6
150	28.57%	98.5	69.57%	1693.1
139	0.00%	0.0	52.17%	1297.7
130	7.14%	163.0	34.78%	589.8
117	14.29%	244.5	34.78%	495.8
107	14.29%	606.5	52.17%	445.4
96	35.71%	804.2	73.91%	639.6
86	42.86%	665.3	56.52%	781.5
78	7.14%	64.0	30.43%	458.4
72	0.00%	0.0	73.91%	584.0
66	35.71%	409.6	56.52%	781.2
62	42.86%	667.2	60.87%	1084.0
58	14.29%	129.0	39.13%	316.2
57	42.86%	440.3	26.09%	625.2
54	35.71%	587.2	26.09%	1215.5
53	28.57%	405.5	73.91%	1778.1
48	42.86%	606.7	65.22%	1826.3
46	21.43%	788.3	69.57%	1302.7
43	28.57%	767.0	69.57%	668.0
40	14.29%	693.5	17.39%	215.0
38.5	28.57%	235.8	47.83%	547.8
37	50.00%	1175.9	73.91%	645.2
34	60.00%	761.6	69.57%	941.6
33	28.57%	549.0	52.17%	300.8
30	21.43%	647.0	60.87%	544.1
28	21.43%	500.7	30.43%	335.9
26	14.29%	624.5	47.83%	315.8
25	7.14%	47.0	65.22%	544.1
23	35.71%	245.2	13.04%	471.7
22	0.00%	0.0	4.35%	30.0

TABLA NO. 2. Datos de frecuencia (%) e intensidad (D.O.), obtenidos a partir de las imágenes digitalizadas de los patrones de reconocimiento de antígenos membranales de *E. histolytica* por muestras de saliva de pacientes e individuos sanos.

Análisis de inmunoplot. Empleando extracto total de *E. histolytica*.

Al comparar la frecuencia de reactividad de las salivas de pacientes con amibiasis intestinal y la de individuos sanos, usando el extracto total se lograron determinar ciertos componentes que son reconocidos únicamente por la saliva de pacientes y no por las del grupo control. Estas comprendieron las proteínas de 110, 58, 46, 44.5, 42, 27, 26, 25 KDa, las cuales son reconocidos por el 20% y 60 % de las muestras de salivas de pacientes (fig. 6A y 7A), la intensidad de reconocimiento por su parte fue variable entre cada una de las muestras (Fig. 6B y 7B).

Los principales componentes que fueron reconocidos por la saliva de pacientes con la enfermedad fueron las bandas de 88, 123 y 29 KDa que corresponde a un 70 %, 60 % y 62 % de frecuencia respectivamente mientras que en el grupo control estas mismas proteínas son reconocidas en un 45%, 23% y 12% respectivamente (Fig. 6A). Ahora bien, en el caso del componente de 68 KDa cuya frecuencia en pacientes es de 52% y de 11 % en individuos sanos, la intensidad de reconocimiento es mayor en estos últimos, siendo superado en este aspecto solo por el antígeno de 135 KDa (Fig. 6A), mientras que la proteína de 123 KDa presentó una frecuencia de 60 % en la muestra de pacientes y 23 % en sanos, pero una intensidad tres veces mayor en pacientes (Fig. 6B).

Por lo que se refiere a las proteínas de 74 y 40 KDa, éstas fueron reconocidas por pacientes en un 48% y en los sanos en un 5%, (Fig. No. 6A) y la intensidad de la primera es 9 veces mayor, mientras la segunda solo el doble de su intensidad en pacientes con respecto a sanos (Fig. 6B).

Otro componente reconocido con gran intensidad por la saliva de pacientes fue el de 49 KDa (Fig. 6B), con una frecuencia de 55 % contra un 18 % detectada en los individuos sanos (Fig. 6A).

Por su parte el 25 % de individuos sanos reconoció el componente de 230 KDa, no presentándose ninguna reactividad con la saliva de los pacientes analizados en este estudio (Fig. 6A).

Análisis de inmunoplot. Empleando extracto membranal de *E. histolytica*.

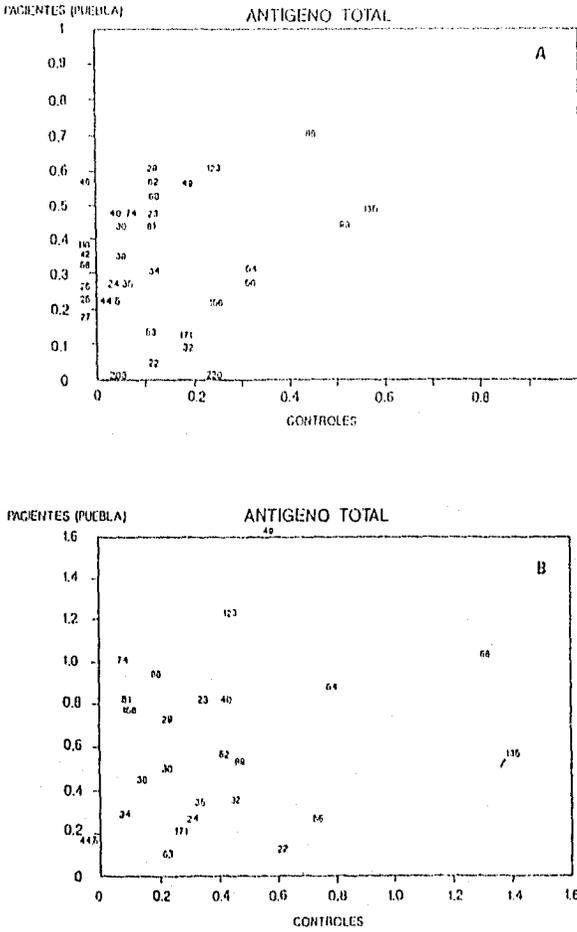
Por lo que se refiere al reconocimiento de las salivas cuando se utilizó el extracto membranal, se observaron seis proteínas reconocidas exclusivamente por las de los individuos enfermos, estas proteínas corresponden a los pesos moleculares y frecuencias de 72 KDa, 75%; 139 KDa, 52%; 225 KDa, 8%; 22 KDa, 5%; 265 KDa y 200 KDa, 4.35% (fig. 8A). A diferencia de lo ocurrido en el análisis con el extracto total, las salivas de los individuos sanos no presentaron exclusividad en el reconocimiento de algún componente.

Así mismo otras proteínas fueron reconocidas por los anticuerpos contenidos en la saliva de pacientes. Las frecuencias observadas en estos estuvieron por arriba del 50 % y por los individuos sanos por debajo del 25% y corresponden a las de: 170, 150, 107, 53, 46, 43, 30 y 25 KDa (Fig. 8A), con intensidades variables, siendo la más acentuada la que corresponde a 170 KDa y en forma mucho más significativa el antígeno de 150 KDa ya que tiene una baja intensidad de reconocimiento en la saliva de individuos sanos (fig. No. 8B).

Por lo anterior podemos establecer la presencia un patrón de reconocimiento por la saliva de pacientes con amibiasis intestinal el cual está constituido por las proteínas de 170, 150, 139, 107, 72 y 25 KDa con una frecuencia superior al 65% y los mismos componentes en individuos sanos resultó ser menor del 25 % (fig. 8A).

Por otro lado y de acuerdo a los resultados del análisis discriminante en el que se utilizaron los 7 antígenos anteriores, se obtuvo un 82% de confiabilidad al agrupar a los individuos enfermos, descartando la infección en el 100% de individuos sanos (Tabla No. 2). Por el contrario al usar los antígenos del extracto total con

estas mismas características de reconocimiento (110, 74, 68, 58, 46, 42, 25), solo se alcanzó un 69.56 %. (Tabla No. 3).



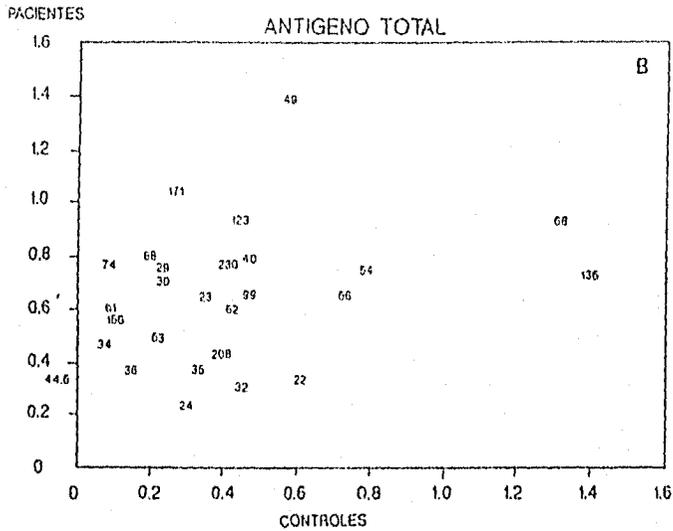
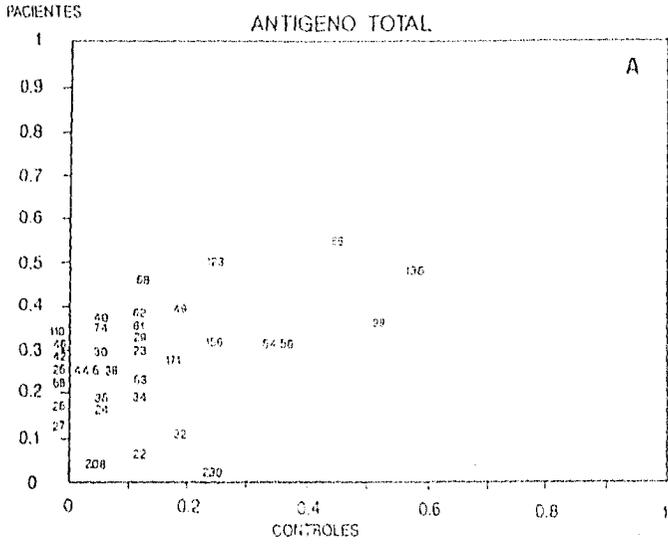


FIG. 7. Inmunoplot de la frecuencia (A) y la intensidad (B) de reconocimiento de antígenos de *Entamoeba histolytica* (extracto total) por muestras de saliva de enfermos de la ciudad del Distrito Federal contra individuos sanos. La gráfica de los puntos se realizó a partir de los datos obtenidos por el programa digital computarizado AMBIS.

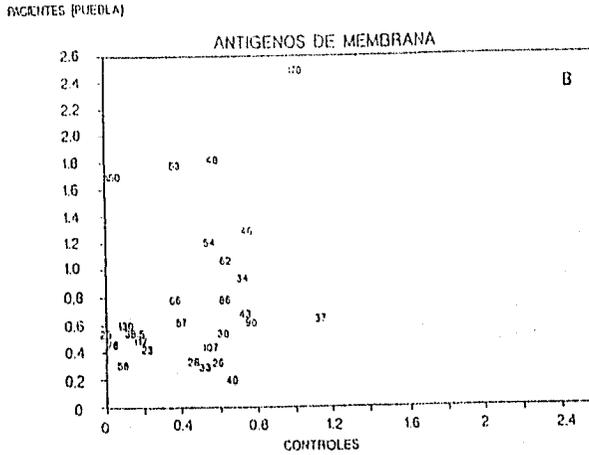
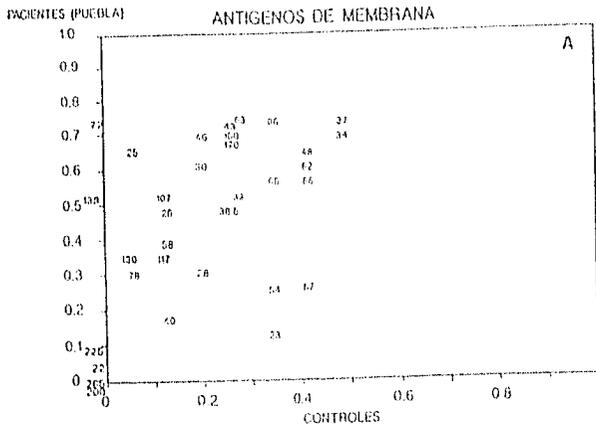


FIG. 8. Inmunoplot de la frecuencia (A) y la intensidad (B) de reconocimiento de antígenos de *Entamoeba histolytica* (extracto membranar) por muestras de saliva de enfermos de la ciudad de Puebla contra individuos sanos. La gráfica de los puntos se realizó a partir de los datos obtenidos por el programa digital computarizado AMBIS.

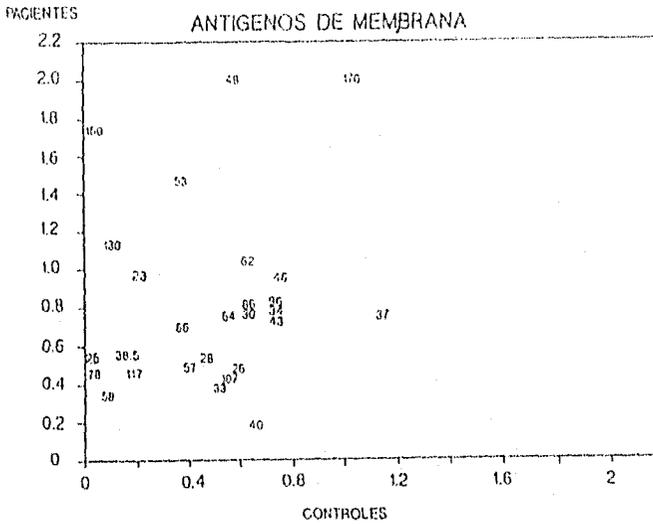
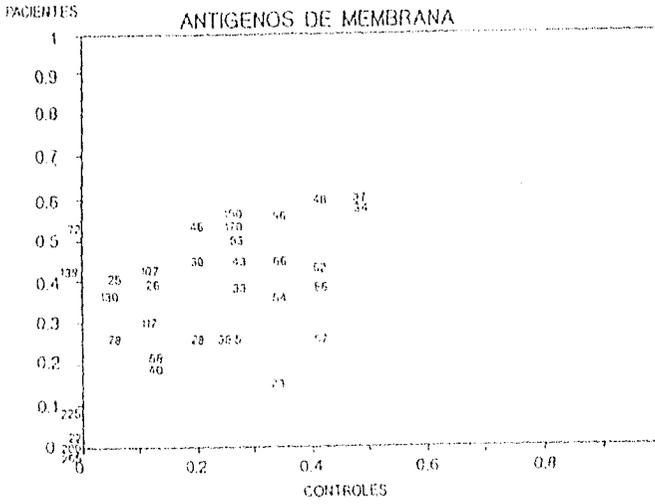


FIG. 9. Inmunoplot de la frecuencia (A) y la intensidad (B) de reconocimiento de antígenos de *Entamoeba histolytica* (extracto membranal) por muestras de saliva de enfermos de la ciudad del Distrito Federal contra individuos sanos. La gráfica de los puntos se realizó a partir de los datos obtenidos por el programa digital computarizado AMBIS.

TABLA 3. Análisis discriminante utilizando los antígenos del extracto total de *E. histolytica*. (110, 74, 68, 58, 46, 42 y 25 Kda).

	totales	Controles	Pacientes
Controles	15 100%	15 100%	0 0%
Pacientes	48 100%	19 39.58%	29 60.42%
Puebla**	23 100%	7 30.43%	16 69.56%

Valores obtenidos:

Usando el reconocimiento de la población total de individuos.

**Usando el reconocimiento de los individuos de Puebla únicamente.

TABLA 4. Análisis discriminante utilizando los antígenos del extracto membranal de *E. histolytica* (170, 150, 139, 130, 72, 53 y 25 KDa).

	Totales	Controles	Pacientes
Controles	14 100%	14 100%	0 0%
Pacientes	47 100%	17 36.17%	30 63.83%
Puebla**	26 100%	7 17.39%	19 82.60%

Valores obtenidos:

Usando el reconocimiento de la población total de individuos.

**Usando el reconocimiento de los individuos de Puebla únicamente.

DISCUSION.

El análisis y la caracterización de componentes antigénicos de *E. histolytica* es necesario para el entendimiento de la relación huésped-parásito en la amibiasis. De la misma manera esto permitiría analizar la respuesta inmune que inducen , así como el uso de estos componentes en el desarrollo de métodos de diagnóstico y profilaxis de la enfermedad y su potencial importancia en estudios de Biología, Bioquímica y Biología Molecular de este protozoario.

Los patrones electroforéticos de las proteínas de *E. histolytica* analizados por EGPA en este trabajo, mostraron diferencias notables con respecto a lo reportado en la literatura, en lo que se refiere al número de componentes que fue 42 en caso del extracto total y 40 para el membranal, así como discrepancias en el rango de peso molecular que estuvo entre 10 y 270 y entre 10 y 230 respectivamente. Aley (1980), reportó la presencia de 18 bandas contenidas entre 18 y 176 KDa de peso molecular en un preparado antigénico de membrana plasmática, estos datos coinciden en parte con los reportados por De la Torre (1991), quién detecta 21 proteínas dentro del mismo rango de pesos moleculares. En otro estudio realizado en el año de 1993 por Das y colaboradores (1982), el número fue de aproximadamente 28 bandas proteicas entre 20 y 210 KDa, pero utilizando un extracto de antígenos solubles. Asimismo Ximénez y col (1993), observaron 53 proteínas que van de los 8 a los 148 KDa en un extracto total de amiba. Los puntos de divergencia de todos estos estudios en cuanto al número y pesos moleculares de las proteínas de *E. histolytica*, son debidas posiblemente a las distintas metodologías usadas para su extracción, como son: el uso de trofozoítos completos, obtención de extractos crudos producidos a través de alternar ciclos de congelación y descongelación, sonicación o en otros casos mediante un proceso de homogeneización. Sin embargo una cosa en común que se observa en la extracción de los antígenos amibianos es la proteólisis de componentes en relación directa con el tiempo de almacenamiento.

En nuestro caso el método para la obtención tanto del extracto total como membranar, usando el choque ácido durante la homogeneización, nos permitió obtener patrones electroforéticos conservados a lo largo del tiempo (6 meses inclusive). Por lo que no fue necesario usar inhibidores de proteasas para la preparación de antígeno.

La respuesta inmune tanto de tipo celular como humoral que se presenta en la amibiasis ha sido considerada como una compleja y amplia red constituida por una serie de compartimentos, mediante los cuales se puede controlar la presencia del parásito. En este aspecto, la respuesta inmune de tipo humoral contra antígenos durante la infección con *E. histolytica* ha sido bien documentada a través de diversos reportes, basados en la actividad de los anticuerpos séricos de individuos con absceso hepático y amibiasis intestinal (Kim y Finkelstein 1978; Knobloch y Mannweiler, 1983).

En varios estudios ha sido posible medir anticuerpos séricos del tipo IgA en individuos con amibiasis intestinal y se ha podido comprobar los títulos altos de esta inmunoglobulina (Campos-Rodríguez y col, 1986), así como su presencia en el suero de pacientes con absceso hepático amibiano, donde es posible tener títulos en correlación directa con anticuerpos de la clase IgG (Shetty y col, 1990). Por otra parte la caracterización de los antígenos identificados por la IgA mediante el uso de técnicas inmunoquímicas reviste gran interés, ya que es un aspecto que actualmente ha recibido gran atención en la respuesta humoral. La presencia de esta inmunoglobulina ha sido detectada en diversos fluidos corporales, por lo que su importancia es muy grande, principalmente a nivel de protección contra diversas enfermedades gastrointestinales (Fubara y Freter, 1973; Gillin y Reiner, 1983), así como para el desarrollo de varias metodologías de diagnóstico aplicadas a la materia fecal, saliva, calostro, etc.

En varios estudios ha sido posible medir anticuerpos séricos del tipo IgA en individuos con amibiasis intestinal y se ha podido comprobar los títulos altos de

esta inmunoglobulina (Campos-Rodríguez y col, 1986), así como su presencia en el suero de pacientes con absceso hepático amibiano, donde es posible tener títulos en correlación directa con anticuerpos de la clase IgG (Shetty y col, 1990). Sin embargo su papel en el establecimiento de la amibiasis y su reactividad con antígenos no ha sido totalmente estudiado hasta ahora.

La saliva de individuos ha sido utilizada para probar la presencia de anticuerpos contra diferentes organismos, tales como *Leptospira* (Vinicius-da Silva y col, 1992) y *Streptococcus* (Katz, 1993), así como la presencia de IgA contra HIV (Zhang y col, 1992). El uso de la IgA contenida en la saliva de individuos también ha sido propuesta para ser usada en métodos de inmunodiagnóstico de la amibiasis, obteniendo resultados con sensibilidades y especificidades altas en niños en edad escolar (del Muro y col, 1990), o bien en pacientes con absceso hepático amibiano (Kelsall y col, 1994).

El análisis de antígenos reconocidos por la IgA mediante el uso de técnicas inmunológicas, es un aspecto que actualmente ha recibido gran atención en la respuesta humoral. La presencia de esta inmunoglobulina ha sido detectada en diversos fluidos corporales, por lo que se sugiere que juega un papel importante, principalmente a nivel de protección como en otras enfermedades gastrointestinales (Fubara y Freter, 1973; Gillin y Reiner, 1983). Considerando esto último se puede proponer que los antígenos reconocidos por esta inmunoglobulina podrían utilizarse en el desarrollo de varias metodologías de diagnóstico aplicadas a la materia fecal, saliva, calostro, etc.

En un estudio realizado por Berber y colaboradores (1990), reportaron que existen antígenos del extracto total de amiba, que son reconocidos ampliamente por los anticuerpos del tipo IgA contenidos en sueros y calostro de mujeres en puerperio y en sueros de pacientes con absceso hepático. Los componentes de 81, 53, 49, 40, 38, 35, 32, 29, 27, y 25 KDa de peso molecular, reconocidos en ese estudio, también son reconocidos por la saliva de pacientes con amibiasis

intestinal utilizados en nuestros ensayos, con una frecuencia de reconocimiento más baja. Asimismo Ximénez y colaboradores (1992), detectaron IgA en el suero de pacientes con amibiasis intestinal, la cual tiene reactividad con antígenos de un extracto total del parásito de manera significativa. La diferencias de la reactividad observadas en nuestro estudio con respecto a estos dos trabajos puede ser debida a la fuente de anticuerpos utilizada, ya que mientras en los primeros usan suero, en este análisis se utilizó la saliva de individuos. Este punto parece ser de suma importancia, ya que Rangel y colaboradores (1992), reportan que pueden existir antígenos, que pueden llegar a ser reconocidos por la IgA contenida en la saliva de pacientes con amibiasis intestinal y no por la del suero de estos mismos o de individuos con absceso hepático amibiano.

Por su parte la proteína de 28 KDa presente en lisados totales de *E. histolytica*, reportada como el principal componente inmunoprecipitado por suero de pacientes con amibiasis invasiva, así como de individuos asintomáticos que eliminan quistes en la heces (Bhattacharya y col, 1990), puede ser reconocida, en el extracto total, en un 58% por la saliva de pacientes y por el 5% de individuos sanos. Nuevamente la fuente de anticuerpos es diferente, sin embargo es necesario considerar que los anticuerpos séricos de un individuo, el cual ha padecido la enfermedad pueden prevalecer por largos periodos a diferencia de los anticuerpos secretorios.

En un estudio llevado a cabo por Linder y colaboradores en 1992, se ha podido identificar una proteína de *E. histolytica*, con un peso molecular de 67 KDa. Usando un ensayo de inhibición lograron distinguir reactividad especie específica en suero de pacientes con amibiasis. En la presente investigación este antígeno (68 KDa) fue reconocido por un 52% de los pacientes, mientras que un 7% de salivas de individuos sanos reaccionó con esta proteína. Sin embargo, la intensidad con que la detectaron los individuos sanos fue tan alta como en pacientes. Esto mismo ocurrió con la proteína de superficie de 29 KDa,

considerada como un indicador de patogenicidad en *E. histolytica* (Flores y col, 1993), que solo fue reconocida por un 48% de los pacientes, pero el 7% de sanos, en este trabajo (30 KDa) estos resultados no descartan que los síntomas de amibiasis en por lo menos la mitad de los individuos puedan ser causados por cepas no patógenas u otros parásitos (aunque no se encontró indicio de ellos en las pruebas parasitológicas), o bien la presencia de portadores sanos en la población de individuos sanos.

Con respecto a otros antígenos membranales o de excreción-secreción, también se han reportado datos acerca del valor en el diagnóstico de la enfermedad. Por su parte Edman y col, 1990, sugirieron un papel muy importante para un componente de 125 KDa en la amibiasis invasiva, el cual además es una proteína que es reconocida por el suero de pacientes con absceso hepático amibiano en un 73 % y al parecer esta involucrado en la protección contra esta enfermedad. En este estudio, no se encontró una proteína que fuera reconocida por la saliva de pacientes o individuos sanos con peso molecular similar en el antígeno de membrana, pero si en el extracto total. Esto puede deberse a que pueden existir factores diferentes que condicionen el establecimiento de amibiasis intestinal y extraintestinal. Por lo que este antígeno pudiera ser un buen candidato para definir esta característica.

En cuanto a la lectina de 170 KDa, cuyo papel en la adhesión a células blanco ha sido bien fundamentado, Zhang y colaboradores en 1992, reportaron que el 90% de los pacientes y el 1% de individuos sanos con amibiasis invasiva de un área endémica, reconocían este componente. En este estudio el 70% de pacientes reconoció esta proteína. En contraste con lo observado por Zhang (1992) donde el 25% de la saliva de individuos sanos reaccionó con este componente. Nuevamente esto sugiere la posibilidad de contar con portadores sanos en la población del grupo control.

Un aspecto interesante lo constituyen los componentes de 230 y 208 KDa presentes en el extracto total y que son reconocidos solo por la saliva de algunos individuos sanos, con intensidad de reacción variable, esto hace necesario evaluar la importancia que representan los antígenos reconocidos por individuos sanos en evitar el establecimiento de la enfermedad, o bien en ser portadores de ella.

Los estudios relacionados con la frecuencia de reconocimiento de proteínas de *E. histolytica* por la saliva de pacientes con amibiasis intestinal, indican que pocos son los componentes que alcanzan frecuencias significativas (mayor del 50%), cuando son reconocidos exclusivamente por saliva proveniente de individuos con la enfermedad y por debajo de este porcentaje por la de aquellos considerados como sanos (fig. 10 y 11).

En este estudio se detectaron anticuerpos específicos de la clase IgA en saliva de pacientes con amibiasis intestinal y nuestros resultados sugieren que en el diagnóstico de este padecimiento, por lo menos mediante inmunoelctrotransferencia utilizando saliva, deben tomarse en consideración grupos de antígenos, debido a la heterogeneidad y complejidad de los patrones de reconocimiento. En este sentido debemos tomar en cuenta que los antígenos membranales son los que se exponen primero a la respuesta inmune del hospedero, aunque queda por evaluar si estos son los mejores candidatos para el desarrollo de pruebas de diagnóstico como esta. Esto último puede ser apoyado por los resultados obtenidos en el inmunoplot y en base a esto el análisis discriminante, en donde se utilizaron las proteínas de 170, 150, 139, 130, 72, 53 y 25 KDa, con las que se obtiene un 82.6% de confiabilidad, aunque se descartan los portadores sanos. Sin embargo, esto podría evitarse al usar antígenos especie-específicos como son el de 29 y 67 KDa. De esta manera se debe considerar la relevancia de estos componentes en la respuesta inmune que se

induce en esta parasitosis, a fin de desarrollar métodos de diagnóstico más sensibles y específicos para este padecimiento.

Finalmente es necesario hacer hincapié en los diferentes factores que pueden influir en los títulos de anticuerpos de la clase IgA en la saliva de individuos como son: el almacenaje por largo tiempo antes de su uso en el laboratorio; determinar la evolución de la enfermedad que han seguido los pacientes, ya que esto puede influir en la prevalencia de anticuerpos y en el patrón de reconocimiento, como lo apunta Téllez-Sierra y colaboradores en 1990. Por último es necesario tener presente que la edad, así como el flujo de saliva de cada individuo participan en los rangos de secreción de IgA (Kugler y col, 1992). Una vez manteniendo bajo control estos aspectos sería posible establecer las estrategias para el desarrollo de pruebas de diagnóstico más certero y abundar en el entendimiento de la relación-huésped parásito.

CONCLUSIONES.

1. Los extractos total y de membrana de *E. histolytica* analizados por densitometría digitalizada, en el ensayo de inmunoelectrotransferencia, presentaron diferencias cualitativas y cuantitativas entre si en función del reconocimiento por los anticuerpos de la clase IgA contenidos en la saliva de pacientes con la amibiasis intestinal así como de individuos sanos.
2. El reconocimiento de los anticuerpos presentes en las muestras de las salivas de pacientes e individuos sanos hacia los antígenos en los dos extractos de *E. histolytica* fue heterogéneo. Así se observaron cuatro patrones característicos en ambas poblaciones de individuos. Estos patrones pueden tomarse en cuenta para distinguir un individuo con la enfermedad de uno sano mediante estudios en los cuales se establezca la dinámica de la respuesta inmune en función de la historia natural de la enfermedad.
3. El antígeno de 29 KDa puede ser un buen candidato para la detección de amibiasis intestinal debido a que la frecuencia con que fue reconocida por las muestras de saliva de pacientes es relativamente alta (60 %), mientras que en los individuos sanos fue de 11 %. Existe la posibilidad de hacerlo en conjunto con los antígenos de 208 KDa y 230 KDa que fueron reconocido solamente por los individuos sanos cuando se utilizó extracto membranal.
4. Se detectaron seis proteínas del extracto membranal que son exclusivamente reconocidas por las muestras saliva de pacientes con una frecuencia por entre el 20 y el 60%, con pesos moleculares de 110, 58, 46, 44.5, 42, 27, 26 y 25 KDa, cuya intensidad de reconocimiento podría aportar datos importantes a la evolución de la enfermedad.
5. Las proteínas reconocidas por la saliva de pacientes, podrían ser usadas en el diagnóstico de esta enfermedad de manera combinada. Con la finalidad de aumentar la frecuencia de todo un patrón de reconocimiento.

6. Se requiere hacer un estudio más amplio sobre la dinámica de la respuesta inmune secretoria en lo que se refiere a los anticuerpos de la clase IgA y en función de la historia natural de la enfermedad.

7. Es necesario que la detección de portadores sanos se realice y evalúe mediante las técnicas ya mencionadas utilizando las proteínas que no sean reconocidas por pacientes con la enfermedad así como con aquellas consideradas como marcadores de patogenicidad.

BIBLIOGRAFIA.

Acosta, G., Cote, V., Isibasi, A., y Kumate, J.. 1985. Anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* de la clase IgA en el calostro de mujeres mexicanas. *Immunol.* 4: 24-27.

Aley, S.B., Scott, W.A. y Cohn, Z. A.. 1980. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 152: 391-404.

Arbo, A., Hoefsloot, M., Ramírez, A., y Santos, J.L.. 1990. *Entamoeba histolytica* inhibits the respiratory burst of polymorfonuclear leukocytes. *Arch. Invest. Med.* 21: 57-61.

Arellano, M., T. y Ortiz-Ortiz, L.. 1974. Algunas propiedades de la globulina específica del suero de pacientes con absceso hepático amibiano. *Arch. Invest. Med.* 5: 487-490.

Arroyave, R.J., Ayala, D.E. y Hermidia, R.C.. 1990. Differences in circannual characteristics of the incidences of amebiasis and giardiasis. *Prog. Clin. Biol. Res.* 341: 717-727.

Barker, D.C. y Swales, L.S (1972) Characteristics of ribosomes during differentiation from trophozoite to cyst in axenic *Entamoeba histolytica* sp. *Cell Differ* 1: 297-306.

Berber, A., Escobar, A., Zamora, M. y Acosta, G.. 1990. Identification of *Entamoeba histolytica* antigens recognized by IgA class human antibodies in sera and colostrum of puerperal women using immunoblotting techniques. *Arch. Med. Res.* 21: 97-101.

Bhattacharya, A., Bhattacharya, S., Sarma, M.P. y Diamond, L.S.. 1990. Metabolic labeling of *Entamoeba histolytica* antigens: characterization of a 28-KDa major intracellular antigen. *Exp. Parasitol.* 70: 255-263.

- Bienenstock, J., y Befus, A.D.. 1985. In gastrointestinal immunity for the clinician (R.G Shorter y J.B. Kirsner, eds), Grune & Stratton, pp 1-22.
- Brown, W.R.. 1970. Parasitología Clínica. 3a. ed. Interamericana, México pp 25.
- Burch, D.J., Li, E., Reed, S., Jackson, T.F.H.G, Stanley Jr, S.L. 1991. Isolation of a strain specific *Entamoeba histolytica* cDNA clone. J. Clin. Microbiol. 29: 696-701.
- Caballero, A., Viveros, M., Salvatierra, B., Tapia, R., Sepúlveda, J., Gutiérrez, G. y Ortiz-Ortiz, L.. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in México. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50: 412-419.
- Campos-Rodriguez, R., Andrade, P., Acosta, G., Barranco, C., Isibasi, A. y Kumate, J.. 1986. Inducción de una respuesta inmune humoral local contra antígenos de *Entamoeba histolytica*. Ach. Invest. Med. 17: 277-282.
- Carrero, J.C., Díaz, M.Y., Viveros, M., Espinoza, B., Acosta, E. y Ortiz-Ortiz, L.. 1994. Human secretory immunoglobulin A anti-*Entamoeba histolytica* antibodies inhibit adherence of ameba to MDCK cells. Infect. Immun. 62: 764-767.
- Crevenna, P.B..1977. Epidemiología de la amibiasis Salud Pública de México. 19: 411-420.
- Cruz-Reyes, J.A. y Ackers, J.P. 1992. A DNA probe specific to pathogenic *Entamoeba histolytica*. Arch. Med. Res. 23: 271-275.
- Das, P., Sengupta, K., Pal, S., Das, D. y Pal, S.C.. 1993. Biochemical and immunological studies on soluble antigens of *Entamoeba histolytica*. Parasitol. Res. 79: 365-371.
- De la Torre, P. 1992. Caracterización antigénica de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. IIB. pp. 60.

Del Muro, R., Acosta, E., Merino, E., Glender, W. y Ortiz-Ortiz, L.. 1990. Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA(antibody dedection. J. Infect. Dis. 162: 1360-1364.

Denis, M. y Chadee, K. 1988. *In vitro* and *in vivo* studies of macrophage function in amebiasis. Infect. Immun. 56: 3126-3131.

Diamond, L.S.. 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science. 134: 336-337.

Diamond, L.S. y Clarck, C.G.. 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J. Eukar. Microbiol. 40: 340-344.

Edman, U., Meraz, M.A., Rausser, S., Agabian, N. y Meza, I.1990. Characterization of an immuno-dominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. J. Exp. Med. 172: 879-888.

Elsdon-Dew, R.. 1968. The epidemiology of amebiasis. Adv. Parasitol. 6:1-62.

Flores, B.M., Reed, S.L., Radvin, J.I. y Torian, B.E.. 1993. Serologic reactivity to purified recombinant and native 29-Kilodalton peripheral membrane protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Microbiol. 31: 1403-1407.

Fubara, E.S. y Freter, R.. 1973. Protection against bacterial infection by secretory IgA antibodies. J. Immunol. 111: 395-403.

Gillin, F.D. y Diamond, L.S.. 1981. Inhibition of clonal growth of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* by metronidazol, quinacrine, and other microbial agents. J. Antimicro. Chemother. 8: 305-316.

Gillin, F.D. y Reiner, D.S.. 1983. Human milk kills parasitic intestinal protozoa. Science. 221: 1290-

González-Montesinos, F., Lee-Ramos A.F., Aguirre-García J.(1971. Influencia del sexo y la edad en la amebiasis invasora del hígado. Arch. Invest. Med. 1: 395-340.

Grundy, M.S., Cartwright,-Taylor, L., Lundin, L., Thors, C. y Huldt, G.. 1983. Antibodies against *Entamoeba histolytica* in human milk and serum in Kenya. J. Clin. Microbiol. 17: 753-758.

Gutiérrez, G. 1986. Epidemiología y control de la amebiasis en México. Arch. Invest. Med. 17: 375-383.

Gutiérrez, G., Ludlow, A., Espinoza, G., Herrera, S., Muñoz, N., Rattoni, N. y Sepúlveda, B.. 1976. National Serologic Survey. II. Search for antibodies against *Entamoeba histolytica* in México (Sepúlveda, B. y Diamond, L.S., eds), Proceedings of the International Conference on Amebiasis, México Instituto mexicano del Seguro Social. 609-615.

Gutiérrez, G., Margain, J., Castañeda, R., Enrique, O., Aubanel, M. y Sepúlveda, B.. 1974. Encuesta serológica nacional. I. Investigación de anticuerpos contra *Entamoeba histolytica* en una localidad semirural de la costa del Golfo de México. Arch. Invest. Med. 5: 475-480.

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

Jalan, K.N. y Maitra, I.K.. 1988 Amebiasis in the developing world. En: Ravdin (ed). Amebiasis. pp 535-632.

Katz, J., Harmon, C.C., Buckner, G.P., Richardson, G.J., Russell, M.W. y Michalek, S.M.. 1993. Protective salivary immunoglobulin A responses against *Streptococcus mutants* infection after intranasal immunization with *S. mutants* antigen I/II coupled to the B subunit of cholera toxin. Infect Immun. 61: 1964-1971.

Kelsall, B.L., Jackson, T.G., Gathiram, V., Salig, S.B., Vaithilingum, M., Pearson, R.D. y Ravdin, J.L.. 1994. Secretory immunoglobulin A antibodies to the galactose-inhibitable adherence protein in the saliva of patients with amebic liver disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 454-459.

Kim, H. y Finkelstein, S.. 1978. serologic response in amebiasis. *Arch. Med. Res.* 9: 357-361.

Knobloch, J. y Manweiler, E.. 1983. Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 727-732.

Krzamowski, W.S. .1988. Principles of multivariate analysis. Logistic discrimination. Claredon Press, Oxford. pp 358-359.

Krestchmer 1984. Immune Phenomena in amebiasis. *Surv. Immunol. Res.* 3: 1-10.

Krestchmer, R., Rico, G. y Diaz-Guerra, O.. 1990. The monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* raises cAMP in human monocytes. *FASEB J.* 4: Abstract No. 3087.

Kugler, J., Hess, M. y Haake, D.. 1992. Secretion of salivary immunoglobulin A in relation to age, saliva flow, mood states, secretion of albumin, cortisol, and catecholamines in saliva. *J. Clin. Immunol.* 12: 45-49.

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

Landa, L., Aubanel, M. y Segovia, E.. 1972. Seroepidemiologia de la amibiasis en adultos. *Arch. Invest. Med.* 2: 377-380.

Landa, L., Capin, R., y Guerrero, M.. 1976. Estudios sobre inmunidad celular en la amibiasis invasora. En: B. Sepulveda y L.S. Diamond (ed). *Memorias de la*

Conferencia Internacional sobre Amibiasis. Instituto Mexicano del Seguro Social, México. 654-660.

Larralde, C., Montoya, R.M., Sciutto, E., Diaz M. L., Govenzensky T. y Coltori E. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hidatid disease patients with r neurocysticercosis and disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40: 282-290.

Linder, E., Lundin, L., Haglund, S., Hallander, H. y Tellez-Sierra, A. 1992. Identification of a parasite-specific cytoplasmic 67 KDa *Entamoeba histolytica* antigen recognized by patients sera and monoclonal antibodies. Arch. Med. Res. 23: 169-172.

Lowry, D.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Martinez-Cairo, S., Gorab, A., Muñoz, O. y Reyes, M. 1979. Caracterización inmunoquímica de los coproanticuerpos en la amibiasis intestinal invasora. Arch. Invest. Med. 10: 121-126.

Martínez-Palomo, A. 1987. Las amibas; enemigos invisibles. Serie La ciencia desde México. vol 47. SEP, FCE. pp 101.

Martinez-Palomo, A. The biology of *Entamoeba histolytica*. Tropical Medicine Research Studies Serus (Wiley & sons), New York. 1982.

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

Miller, H.R.P.. 1980. The structure, origin and function of mucosal mast cells. A brief review. Biol. Cell. 39: 229-.

O'Shea-Alvarez, M. S. y Treviño, N. 1985. Presencia de anticuerpos anti-amiba en secreciones de ileón, colon y materia fecal de pacientes con absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Med., 16: 401-409.

Pittman, F.E. El Hashimi, W.K and Pittman, J.C. 1973. Estadies of human amebiasis. Light an electron microscopic observations of colonic mucosa and exudate in acute amebic colitis. Gastroenterol. 65: 588-603.

Rangel, A., Mora, N., Espinoza, A., Cristancho, M. y Hernández, M.. 1992. IgA reactivity in patients with intestinal or hepatic amebiasis. Arch. Med. Res. 23: 259-260.

Ravdin, J.I., Croft, B.Y. y Guerrant, R.L.. 1980. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. J. Exp. Med. 152: 377-390.

Ravdin, J.I.. 1986. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba Histolytica*: studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. Revs. infect. Dis. 8: 247-260.

Ruiz-Palacios, G.M., Castañon, G., Bojalil, R., Tercero, E., Rausser, S., Herbert, L., Agabian, N. y Martínez-Palomo, A.. 1992. Low risk of invasive amebiasis in cyst carriers. A longitudinal molecular seroepidemiological study. Arch. Med. Res. 23: 289-291.

Salata, R.A., Martínez-Palomo, A., Canales, L., Murray, H.W., Treviño, N. y Ravdin, J.I.. 1990. Suppression of lymphocyte responses to *Entamoeba histolytica* antigen by immune sera. Infect. Immun. 58: 3941-3946.

Sargeant, P.G., Williams, J.E. y Grene, J.D.. 1978. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isozyme electrophoresis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 519-521.

Sexton, D.J., Krogstad, D.J., Spencer H.C. Jr, Healy, G.R., Sindair, S. Sladge, C.E. y Shutz M.G.. 1974. Amibiasis in a mental institution. Serologic and epidemiologic studies. Am. J. Epidemiol. 100: 414-23.

Shetty, N., Nagpal, S., Rao, P.V. y Schroder, H.. 1990. Detection of IgG, IgA, IgM and IgE in antibodies in invasive amoebiasis in endemic areas. Arch. Med. Res. 21: 41-46.

Smith, J.W. , McQuay, R.M., Ash, R.L., Melvin, D.M., Orihel, T.C. y Thompson, J.H. (eds). 1979. Diagnostic Medical Parasitology Intestinal protozoa. America Society of Clinical Pathologists. Education Products Division. USA.

Tachibana, H., Kobayashi, S., Takekoshi, M., Ihara, S.. 1991. Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polimerase chain reaction. J Infect. Dis. 164: 825-826.

Tanich, E. y Burchard, G.D.. 1991. Differentiation of Pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified *in vitro*. J. Clin. Microbiol. 29: 250-255.

Télez-Sierra, A., Córtez-Ruiz, L., Aust-Kettis, A., Huldt, G. y Jonsson, J. y Loftenius, A.. 1990 Antibodies against *Entamoeba histolytica* antigens in sera from individuals with amoebiasis of different localization. Arch. Invest. Med. 21: 63-67.

Thomas,, T.C. y McNamee, M.G.. 1990. Purification of membrane proteins. In: Deutscher (ed). Guide to protein purification. IX. Specialized purification procedures. Methods Enzimol. 182: 499-520.

Towbin H.T, Staehelin, T, y Gordon, J.. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76 : 4350-4354.

Trissi, D.. 1982. Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal host. Rev. Infect. Dis. 4: 1154-1184.

Tse, S.K y Chadee, K. 1991. The interaction between intestinal mucus glycoproteins and enteric infections. Parasitol. Today. 7:163-172.

Tsutsuni, V., Mena, R. y Martinez-Palomo, A.. 1984.. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. Am. J. Pathol. 117: 81-89.

Vinicius-da-Silva, M., Camargo, E.D., Jose-Vaz, A. y Batista, L.. 1992. Immunodiagnosis of human leptosporosis using saliva. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 86: 560-561.

Voller, A., Bidwell, D.E. y Bartlet, A. 1979. The enzimed-linked immunosorbent assay (ELISA). Dynatech laboratories, Inc. pp 25-41.

Walsh, J.A.. 1986. Problems and recognition and diagnosis of amebiasis. estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8: 228-238.

Ximénez, C., Sosa, O., Leyva, O., Morán, P. y Melendro, E.I.. 1992. Western blot of *Entamoeba histolytica* antigenic fractions: reactivity analysis with sera from intestinal amoebiasis patients. Ann. Trop Med. and Parasitol. 80: 121-127.

Zhang, X., Constantine, N.T. y Bansal, J.. 1992. Rapid HIV tests: Two for the price of one. Lancet. 340: 1541.

Zaman-Vigar, C. 1979. Atlas of Medical Parasitology American, 4ta ed. USA pp 234.