

302827

8
20/



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

**CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**AISLAMIENTO DE UN ALERGENO DE E. Histolytica
DEMOSTRADO POR ANAFILAXIA CUTANEA
PASIVA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARIA ALEJANDRA HUERTA ZEPEDA**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

INTRODUCCION

1.- INFORMACION GENERAL DEL TEMA

2.- PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

2.1.- Diseño del experimento

2.2.- Material biológico

2.3.- Metodología

2.3.1. Cultivo axénico de E. histolytica

2.3.2. Recolección, lavado y prueba de viabilidad

2.3.3.- Fraccionamiento proteico de la cepa de E. histolytica HM-1 IMSS

2.3.4.- Inmunización de los ratones Balb-c con un homogenado de E. histolytica,

2.3.4.1.- Sacrificio de los animales y recolección del suero

2.3.5.- Inmunoelectroforésis en el suero de los ratones inmunizados con E. histolytica .

2.3.6.- Inmunización de ratas wistar con el suero de ratones conteniendo los anticuerpos anti-amiba.

2.3.7.- Investigación del alérgeno en las fracciones proteicas de E. histolytica obtenidas en columna mediante inmunización cutánea pasiva.

3.- RESULTADOS

4.- DISCUSION

5.- RESUMEN

6.- CONCLUSIONES

APENDICE

Material de vidrio, equipo y reactivos

Reactivos

Cultivo axénico de E. histolytica.

Caldo nutritivo TY

Lavado y tratamiento del Ultrogel

Determinación de la concentración de proteínas y su preparación.

Preparación de los geles de agarosa.

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

El significado de la IgE en el suero de individuos parasitados es relevante, porque nos da la posibilidad de señalar la presencia del parásito en el huésped mediante una reacción de hipersensibilidad de tipo inmediato. (7)

Los estudios iniciales que demostraron la posibilidad de llevar a cabo esta reacción en pacientes con amibiasis, se basaron en la concentración significativa de IgE en el suero, así como en la correlación entre la IgE total y la IgE específica anti-amiba determinada por RIA en pacientes con amibiasis (33). Así mismo, se ha observado que al llevar a cabo pruebas cutáneas en pacientes con amibiasis estas fueron positivas en el 92% de los casos (36 y 37) lo cual determina una relación entre la seropositividad y las pruebas cutáneas.

Este hecho abre la posibilidad de utilizar -con fines de diagnóstico- reacciones de hipersensibilidad en estos enfermos (24).

Sin embargo, los estudios llevados a cabo en una población africana señalaron que la presencia de IgE específica (anti-amiba) se presentó solamente en el 20% de los pacientes infectados con amibas (13).

De igual manera, en Brasil (9) se demostró que los niveles de IgE en pacientes con amebiasis aparentemente no mostraron diferencias significativas con respecto a individuos sanos, aunque no se mencionó si estos pacientes estaban bajo medicamentos de inmunosupresión, pues es bien conocido que esto podría modificar la síntesis de anticuerpos incluyendo a los de esta clase (7, 16 Y 17).

En el absceso hepático amebiano se produce una respuesta inflamatoria muy importante, con la participación de linfocitos, monocitos y eosinófilos, estos modulando la reacción inflamatoria producida por la presencia del parásito.

Los estudios de Landa (21) demostraron que la inmunidad celular en el absceso hepático, juega un papel muy importante, pues en las etapas iniciales no se encuentra alterada, pero posteriormente se presenta un estado de inmunosupresión transitoria en donde la relación de linfocitos (T4/T8) se encuentra disminuida (8, 16, 34), explicandonos así el desarrollo del absceso hepático amebiano.

Sin embargo, suponemos que uno de los factores que condicionan la positividad de esta reacción de hipersensibilidad se refiere a la forma de presentar el antígeno, puesto que en los estudios antes mencionados se

ha utilizado un extracto crudo, siendo esta una de sus limitantes. Por esta razón, consideramos que podrían mejorarse estas pruebas aislando un alérgeno de E. histolytica, cuya actividad podría ser demostrada con pruebas de PCA (anafilaxia cutánea pasiva), (6, 14, 15, 27, 30, 35, 38).

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de investigación de Parasitología del Hospital Infantil de México, bajo la asesoría de la Dra. Enedina Jiménez C.

HIPOTESIS

La hipótesis de trabajo fue considerar que algunos componentes de E. histolytica son capaces de inducir anticuerpos citotrópicos de la clase IgE, los cuales pueden ponerse de manifiesto por una reacción de Anafilaxia Cutánea Pasiva (PCA).

OBJETIVO

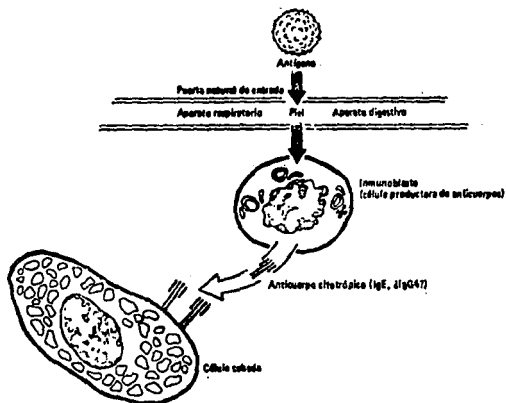
El objetivo de este trabajo fue aislar un alérgeno de E. histolytica pudiendo demostrar su actividad experimentalmente por PCA sirviendo como base para después ser utilizado en pruebas de diagnóstico.

CAPITULO I

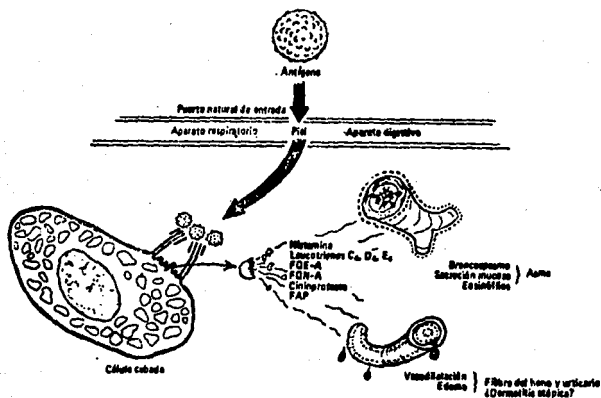
INFORMACION GENERAL DEL TEMA

La reacción de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) fue inicialmente descubierta por Portier y Ricket (7), quienes observaron que la aplicación de una segunda dosis de antígeno en un individuo, producía en él una reacción de un gran daño y frecuentemente la muerte a causa de una reacción de hipersensibilidad inmediata.

Los anticuerpos citotrópicos que intervienen en la sensibilización anafiláctica son de la clase IgG e IgE (29 y 30). Los modelos moleculares de este fenómeno anafiláctico en animales experimentales, demuestran que la fracción "Fc" de la inmunoglobulina se fija a la superficie de los mastocitos, sensibilizando de esta manera al animal.



Una segunda exposición del antígeno localiza a la fracción " Fab " de los anticuerpos fijados en la célula (mastocitos) y reacciona con ellos, produciéndose la liberación de histamina y otros mediadores de la anafilaxia como la sustancia de reacción lenta (SRS-A), bradicinina, factor quimiotáctico de los eosinófilos, factor activador de plaquetas, etc., (1, 14, 20).



De igual manera la figura 2 muestra la segunda fase de este fenómeno de hipersensibilidad.

Sin embargo este fenómeno puede controlarse por la presencia de poblaciones de macrófagos los que al tener receptores para la fracción "Fc" de la IgE, modifican la manifestación de esta reacción de hipersensibilidad (10, 7).

Otro mecanismo de regulación es la presencia de LT supresores (T8), que actúan sobre las células plasmáticas encargadas de producir la IgE (7, 8 y 15) limitando también la reacción.

Experimentalmente la metodología más utilizada para demostrar la IgE es la PCA, determinada en la piel de ratones sensibilizados. Esta prueba es más reproducible cuando se lleva a cabo en la oreja, por ser la región más translúcida, en donde la reacción anafiláctica se hace visible fácilmente. (6).

La reacción de PCA ha sido probada en diferentes razas de ratones (2, 13, 14) demostrándose una mayor sensibilidad utilizando razas puras obteniendo resultados más reproducibles. Fue por ello que en nuestro estudio utilizamos ratones Balb/c criados en consanguinidad.

CAPITULO II

PARTE EXPERIMENTAL

2.1.- Diseño del experimento

AISLAMIENTO DE UN ALERGENO DE E. histolytica DEMOSTRADO POR ANAFILAXIA CUTANEA PASIVA

Cultivo de E.histolytica en forma axénica

Cosecha de los trofozoitos

Lavado de las amibas mediante
centrifugación a 4 C

Homogenización

Fraccionamiento
en columnas Aca
44 de ultragel

Determinación
proteínas
para localización
de los picos de
elución.

Inoculación a ratones Balb-c

Diálisis de
los picos de
elución

Clasificación de los ratones
y separación del suero.

Liofilización
de las fracciones.

Inmunoelec-
troforésis

Inmunización
PC en ratas

Inyección In-
tradérmica de
las fracciones
proteicas

REACCION DE ANAFILAXIA CUTANEA PASIVA

2.2.- Material biológico.

- 120 ratones Balb-c machos de ocho semanas donados por el Instituto de Investigaciones pecuarias de Palo Alto. Edo. de México.
- 30 ratas Wistar machos de 30 días con peso aproximado de 125 g.
- Cepa de Entamoeba histolytica HM-1 IMSS cultivada axénicamente.

2.3.- Metodología

2.3.1.- Cultivo axénico de E. histolytica

Las siembras se hicieron en medio TY-18 con inóculos de 40 000 trofozoitos por cada tubo de 125 x 15 mm y y 160 000 por caja.

Se incubaron durante 72 h a 35.5 C los tubos y las cajas se mantuvieron en posición horizontal y las resiembras se efectuaron en forma semejante, es decir: se tomaron 0.6 ml de los tubos donde se

obtuvo un crecimiento óptimo de 1 200 000 de trofozoitos y por caja 6 000 000 y se siembran en un nuevo medio de cultivo.

2.3.2.- Recolección, lavado y prueba de viabilidad.

Los tubos y las cajas se colocaron en baño de hielo, para que se desprendieran las células de las paredes, las cuales se pasaron a tubos falcon de 50 ml estériles, se centrifugaron a 350 x G durante 15 minutos a 4 C.

El sedimento se lavó con solución reguladora de fosfatos (pH 7) centrifugando nuevamente a 350 x G durante 5 minutos a 4 C, repitiendo la operación dos veces más.

La viabilidad, se comprobó periódicamente examinando cada 6 h utilizando la tinción vital con azul tripano al 0.2% observandose una buena viabilidad, es decir con un 93% de células vivas.

Se determinó el número de amibas en una cámara de Neubauer. Se contaron cinco cuadros de 0.1 mm y la cantidad de amibas se multiplicó por 2 000, el resultado fue el número de amibas por mililitro.

2.3.3.- Fraccionamiento proteico de la cepa de E. histolytica HM-1 IMSS.

Los trofozoitos de las amibas contenidos en el sedimento fueron lisados mediante cambios bruscos de temperatura; se introdujeron primero en una mezcla crioscópica (acetona y hielo seco) y después se descongelaron, este procedimiento se repitió tres veces. El lisado se centrifugó durante 20 minutos a 400 x G a 4 C.

El sobrenadante que contenía los componentes solubles se fraccionó mediante cromatografía en columna ACA 44 sobre ultrogel.

El sobrenadante se colocó cuidadosamente sobre la superficie del ultragel quedando perfectamente distribuido, y se pasó con un flujo de PBS constante de 18 ml/h, las fracciones (de 2 ml) fueron recolectadas mediante un colector de fracciones LKB redirac 2112 en tubos. Los levigados se unieron de acuerdo al área de pico formado como se observa en la gráfica # 1. área del pico formado.

Se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry en los picos de elución. Las lecturas fueron realizadas en los 520 nm.

Los picos fueron dializados contra agua destilada durante 48 h a 4 C.

Finalmente los picos de elución proteica fueron liofilizados en una liofilizadora Freezadryer Labconco por ocho horas.

2.3.4.- Inmunización de los ratones Balb-c con un homogenado de E. histolytica.

60 ratones fueron inmunizados con un homo-

genado de 5×10 trofozoitos lavados, y previamente centrifugados $400 \times G$ a $4 \cdot C$ durante 20 minutos, la otra parte del sobrenadante (cfr. 2.3.3.) cuya concentración aproximada de proteína fue de 2 mg/ml se utilizó para inmunizar intradérmicamente a los seis lotes de diez ratones Balb-c de cuatro semanas durante dos meses.

2.3.4.1.- Sacrificio de los animales y recolección del suero.

Al finalizar el esquema de inmunización se extrajeron 2 ml de sangre por punción cardiaca. La sangre se recolectó en tubos falcon estériles, dejándolos 24 h a $4 \cdot C$ para obtener mayor volumen de suero.

Posteriormente se vió la presencia de anticuerpos por inmunolectroforesis.

2.3.5.- Inmunolectroforesis del suero de los ratones inmunizados por E. histolytica.

Preparación de los geles de agarosa. (ver apendice).

Corrimiento electroforético.

En una placa de vidrio cubierta de agar se hizo un canal longitudinal y un orificio central. El antígeno de E. histolytica es colocado en el pozo. Las placas se colocaron dentro de la cámara de Helena, que contenía la solución reguladora de veronal. Se separó en un campo eléctrico con una intensidad de corriente de 45 miliamperes y 120 volts, luego se colocó el suero de los ratones en los canales y se dejó difundir. Se guardaron a 5 C, después de 24 h se observaron los resultados.

2.3.6.-Inmunización de ratas Wistar con el suero de ratones conteniendo los anticuerpos anti-amiba.

Diez ratas Wistar fueron inmunizadas intradermicamente con 0.1 ml del suero de

los ratones conteniendo los anticuerpo anti-amiba en una concentración proteica de 700 mg/ml.

Cinco ratas fueron consideradas como control.

2.3.7.- Investigación del alergeno en las fracciones proteicas de E. histolytica obtenidas en columna de cromatografía AcA 44 de ultrogel mediante inmunización cutánea pasiva.

Las ratas Wistar ya inmunizadas -a los ocho días- fueron rasuradas en la cavidad abdominal. 1 mg/ml de cada pico de elución proteica fue inyectado intradermicamente para probar la capacidad de alergeno en ellos.

Se utilizaron como controles, el medio de cultivo, albúmina sérica bovina, en la misma concentración que las proteínas, y, PBS.

La lectura se realizó a los 15 y 30 minutos y 1, 6, 12 y 24 h.

El periodo de sensibilización en las ratas se encontró a las 24 h.

La presencia de eritema fue evaluado correspondiendo 0.5 mm a una (+).

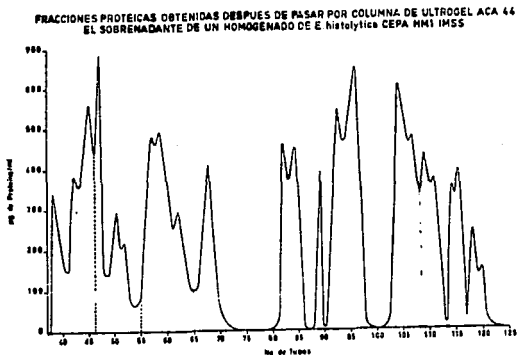
CAPITULO III

4. RESULTADOS

El fraccionamiento proteico de E. histolytica fue obtenido después de pasar por la columna de cromatografía Ultrogel AcA 44 un homogenado de 5×10^7 trofozoitos. Este dió como resultado doce picos de elución como se muestra en la figura # 3.

La concentración proteica de cada fracción fue determinada por el método de Lowry. Esta indicó que osciló aproximadamente entre 137 a 700 $\mu\text{g/ml}$.

Al unirse estas fracciones para constituir los doce picos de elución las concentraciones proteicas contenidos en ellos se incrementaron como la muestra la tabla 1.



Concentración proteica en mg/ml y volumen total en los picos de elución obtenidos por cromatografía en columna.

Picos de elución	Concentración g/ml	Concentración en g/vol total.
I	218	437
II	320	1282
III	583	1750
IV	155	931
V	477	2387
VI	441	1767
VII	390	390
VIII	483	3382
IX	456	2280
X	366	1832
XI	364	1092
XII	174	524

A los ratones Balb-c se les inyectó un homogenado de E. histolytica desarrollándose en el suero de éstos -después de 30 días- la presencia de anticuerpos demostrada por inmuno-electroforesis.

Una vez que los anticuerpos se habían formado en los animales, estos fueron sacrificados para obtener el suero y transferirlo pasivamente al lomo de las ratas Wistar siguiendo el protocolo mencionado en material y método (30).

Para ello se rasuró el lomo de los animales y se dibujó un cuadrículado donde se inyectó intradérmicamente 0.1 ml de cada una de las fracciones proteicas contenidas en los doce picos de elución tratando de investigar en que fracción se localizaba la proteína con posible actividad de alérgeno.

De igual manera se inyectaron intradérmicamente a las ratas Wistar control el medio de cultivo, albúmina sérica bovina y PBS en iguales proporciones.

La fracción III dió como resultado la reacción de Anafilaxia Cutanea Pasiva mas importante formándose un eritema inflamatorio de + 0.5 mm de diametro después de 20 minutos.

Los resultados obtenidos con los controles antes mencionados dieron reacciones negativas.

CAPITULO IV

DISCUSION

El papel relevante de la IgE en la amibiasis se ha limitado por diversos factores, entre otros, la falta de información en relación a sus posibles mecanismos de acción a nivel intestinal y sistémico (37). Por otro lado los títulos de esta inmunoglobulina han hecho que en ocasiones pase desapercibida, restandole importancia en su aplicación. (33).

Otro factor determinante es la presencia de IgA, la cual, a nivel intestinal, puede bloquear a la IgE siendo esta otra de las causas de que este parámetro haya sido poco utilizado (18 y 20).

Los estudios iniciales con esta inmunoglobulina (9, 13, 36) mostraron que la IgE es importante en amibiasis porque existe una relación directa entre el aumento de IgE anti-amiba y la severidad de la infección, atribuyendo esto a la formación de anticuerpos IgE específicos.

Se ha observado (20 y 38) que la liberación de histamina, en mastocitos y leucocitos en pacientes con absceso hepático amibiano, esta disminuida; por que la concentración no es igual en el período agudo de la enfermedad que en su recuperación.

Otro hecho interesante (13 y 27) es la presencia de copro-anticuerpos de la clase IgE, revelandose que este parámetro tiene mucha importancia de acuerdo al papel que juegan estos anticuerpos en la mucosa intestinal, es decir, si son protectores o producen daño en una amibiasis invasiva intestinal (10 y 20).

Nuestros resultados mostraron que fue posible obtener una fracción proteica con capacidad de alérgeno, esto fue probado "in vivo". De igual manera los estudios (38) llevados a cabo con la cepa HK-9, demostraron que fue posible estimular la producción de anticuerpos de la clase IgE, cuando se usó la fracción del pico II, el cual estuvo contenido a los 98 ml.

Al comparar nuestros resultados con los mencionados anteriormente, en donde utilizaron una columna de cromatografía semejante a la de Ultrogel AcA 44, observamos que tuvo una coincidencia en donde muestra la fracción III que correspondió a 94 ml por lo que inferimos que el peso molecular podría ser semejante, correspondiendo este de 25000 a 27000 daltons que es el peso molecular que define al de los alérgenos. Podríamos suponer, que a pesar de que trabajamos con una cepa de amiba diferente, la composición del alérgeno fue semejante.

Pensamos que la presencia de estos anticuerpos de la clase IgE no ha sido abordada en forma importante.

Sin embargo suponemos que estos anticuerpos seguramente contribuyen a la patología de la amiba, como es la reacción de hipersensibilidad "in situ" por la degranulación de los linfocitos y los mastocitos a nivel de la mucosa intestinal.

Este es un mecanismo de defensa del huésped que puede explicarnos la rápida respuesta inflamatoria que acompaña a la amibiasis intestinal. De aquí la importancia que podría tener el desarrollo de una reacción anafiláctica en la amibiasis.

Por otro lado el utilizar un alérgeno aislado de E. histolytica representa potencialmente una gran ayuda para el médico desde diferentes aspectos: Primero desde el punto de vista diagnóstico pues en la práctica diaria de la medicina podría, mediante su aplicación intradérmica diferenciar si se trata de un absceso hepático amibiano o de otro tipo de absceso hepático, así mismo se podría utilizar en estudios epidemiológicos ahorrándole al paciente las molestas pruebas de diagnóstico que se tienen en la actualidad.

Siendo la amibiasis uno de los problemas de salud más importantes para México, la obtención de esta fracción proteica contribuye en forma importante para un mejor entendimiento de este problema en nuestro país.

CAPITULO V

RESUMEN

1. Se cultivo E. histolytica cepa HM-1 IMSS en forma axénica para método de Diamond.

2. Con un homogenado de E. histolytica cepa HM1-IMSS de 2 mg/ml mezclado se inmunizaron a 40 ratones machos Balb-c de un mes de edad.

3. Se obtuvo el suero de estos ratones y se transfirió pasivamente a ratas de la raza Wistar de aproximadamente 200 gr.

4. Mediante una columna de cromatografía ACA 44 de ultrogel se llevó a cabo un fraccionamiento proteico de las amibas (E. histolytica) del cual se obtuvieron doce picos de elución.

5. Se probó la capacidad de alérgeno en las ratas inmunizadas pasivamente con las fracciones proteicas aisladas por cromatografía en columna.

6. Se utilizaron tres controles negativos constituidos por a) sol. reguladora de fosfatos (PBS), b) el medio de cultivo, y c) albúmina sérica bovina.

7. Se contó con un lote control de ratas a las cuales previamente se comprobó la ausencia de anticuerpos anti-amiba.

8. El pico de elucion III obtenido del fraccionamiento proteico dió una reacción de hipersensibilidad positiva de 0.5 mm a los 20 minutos, los demás fueron negativos.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

De acuerdo a la hipótesis presentada por nosotros la fracción proteica con capacidad de alergeno se localizó en el pico de elución III.

Basandose en el hecho de que, experimentalmente, los ratones inmunizados pasivamente con anticuerpos citotrópicos de la clase IgE, dieron una reacción positiva de hipersensibilidad pasiva cutánea al inyectar la fracción proteica contenida en el pico de elucion III.

La posibilidad de utilizar esta reacción en humanos es importante para el médico, pues en poco tiempo podría discriminar si se trata de un absceso hepatico amibiano o de otra indole (piogeno, etc.).

La IgE tiene relevancia en este trabajo pues es la que pone de manifiesto la presencia del antígeno de E. histolytica capaz de inducir la reacción que se planteó.

Como ya mencionamos los mastocitos tienen receptores para esta inmunoglobulina en la fracción "Fc".

De tal manera que al inocular el antígeno con especificidad en la fracción "Fab" del anticuerpo da como

respuesta la liberación de histamina y otras sustancias mediadoras de los mastocitos, produciéndose un proceso inflamatorio manifestado por eritema.

En base a lo antes mencionado, pensamos que la IgE tiene un papel relevante en la amibiasis desde diferentes puntos de vista; i) el de patogenicidad "in situ" en la mucosa produciéndose una reacción inflamatoria de hipersensibilidad ii) Su aplicación como lo revela este estudio en donde se demostró que potencialmente es de un gran valor clínico al darnos una pauta diagnóstica.

APENDICE

Material de vidrio, equipo y reactivos:

tubos de rosca de 125 x 16 mm

Pipetas Pasteur

Pipetas de 10 ml

Pipetas de 5 ml

Pipetas de 1 ml

Cajas Nunc de 350 ml

Cajas Nunc de 50 ml.

Matraces Erlenmayer de 250, 500, 1000 ml

Matraces Erlenmayer con tapón de rosca

Probeta de 50, 250, 500 y 1000 ml

Jeringas de insulina

Termómetro

Micropipetas de 100 y 50 microlitros. Sigma Chemical Co.

Columna para cromatografía LKB 2137-026

Colector de fracciones LKB

Redirac 2112

Fuente de Poder LKB 2138

Uvicord S LKB

Graficador LKB 2210-02

Bomba peristáltica LKB 4912

Bomba para vacío
Cámara de Neubauer
Centrífuga Sorval con refrigeración, modelo RC-5
Centrífuga clínica International
Espectrofotómetro Coleman
Incubadora
Balanza analítica
Placas para hemaglutinación Limbro
Cámara de electroforesis Helena
Potenciómetro Corning
Papel filtro Whatman No. 1, 3, cualitativo.

REACTIVOS

Suero Bovino	Microlab
Mezcla vitamínica	Microlab
Biosate	BBI Microbiology S
Destroxa anhidra	Baker
Cloruro de sodio	Baker
Fosfato monobásico de potasio	Baker
Fosfato dibásico de potasio	Baker
Clorhidrato L Cisteína monohidratada	Sigma
Acido Ascórbico	Baker
Citrato de amonio férrico	Sigma
Carbonato de sodio	Baker
Hidróxido de sodio	Baker

Tartrato de sodio y potasio hidratado	Baker
Sulfato de cobre hidratado	Millinckrodt
Fosfato monobásico de sodio hidratado	Baker
Eter Etilico	Baker
Albumina sérica	
Agarosa	
Ultrogel ACA 44	LKB

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Cultivo axénico de E. histolytica.

Caldo Nutritivo TY

Biosate	3.0 g
Dextrosa anhidra	1.0
Cloruro de sodio	0.2
Fosfato monobásico de potasio	0.06
Fosfato dibásico de potasio	0.01
L- Cisteina	0.1
Acido ascórbico	0.02
Citrato de amonio férrico	0.00228
Agua bidestilada	82 ml

Se disuelven los reactivos en el orden mencionado en un volumen aproximado de 50 ml de agua bidestilada; se ajusta el pH 6.8-6.9 con hidroxido de sodio al 40% y llevar al volumen total. Se filtra con el papel Whatman No. 1 y se esteriliza a 121 grados centígrados durante 15 minutos.

Lavado y tratamiento del ultragel Aca 44. Se utilizaron 350 g de ultragel, fué lavado cinco veces con agua bidestilada, dos con PBS 0.1 molar, pH 7.

Se desgasificó durante 3 horas al vacío.
Después se empaquetó una columna LKB de
45 cm de altura y 2.5 cm de diámetro.

Determinación de la concentración de proteínas por
el Método de Lowry en los picos de elución.

Sol. de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de
sodio 0.1 N. Se pesó un gramo de carbonato de
sodio, disolviéndose en 50 ml de NaOH 0.1 N.

Sol. 1.

Sol. de tartrato de sodio al 1%. Se pesó un g de
tartrato de sodio y se disolvió en 100 ml de agua
bidestilada. Sol. 2.

Sol. de sulfato de cobre y se disolvió en 100 ml
de agua bidestilada. Sol. 3.

Reactivo A: justamente antes usarse se toma un ml
de la solución 3 mas 50 ml de la solución 1.

Reactivo B: reactivo folin ciocalteau.

Curva de calibración.

Sol. de albúmina sérica como patrón.

Curva patrón. A partir de la sol. proteica patrón
se realizan diluciones de sol. salina isotónica de
manera que al manejar volúmenes de 0.4 ml tengan:
0.01 mg, 0.02 mg, 0.03 mg, 0.05 mg, 0.10 mg, 0.15

mg y 0.20 mg de proteínas.

A cada uno de estas se agregan 2 ml del reactivo A, se dejan en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos después se agregan 0.2 ml de reactivo B, se mezclan y se dejan en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Por último, se realiza la lectura de D.O. en el espectro Coleman a 520 nm, con estos datos se construye la curva patrón. Al graficar: concentración proteica contra densidad óptica.

Los antígenos en solución se someten al mismo procedimiento.

Diluciones 1:10 y 1:20 en cada caso. Los resultados de D.O. obtenidos se interpolan en la curva patrón una vez que se conoce la concentración proteica de cada solución se ajusta a 2 mg/ml para su uso.

Preparación de los geles de agarosa.

Se utilizó una solución reguladora de Barbitál-Sodio, ácido barbitúrico pH 6.8 (laboratorios Helena). Los 18 g contenidos en el sobre se disolvieron en 1000 ml de agua destilada.

De ésta solución se tomaron 100 ml a los que se

agregó 1 g de agarosa (SIGMA CHEMICAL) Se puso en ebullición durante 15 minutos en un matraz con tapon oradado para permitir la salida del mínimo de vapor; 3 ml de esta solución fueron colocados en portaobjetos y se esperó a que solidifique. Se hicieron 2 canales longitudinales en los extremos y un orificio central.

BIBLIOGRAFIA

1. Befus Dean, Biennenstock John.
Mast cell differentiation and heterogeneity
Immunology Today (64) 6 No. 10 pp 281-312; 1985
2. Braga F. Mota I.
Homologous PCA in mice and Heterologous PCA induced in rats
with mouse IgE
Immunology 30: 655-669; 1976
3. Brian E. Bozelka, Marjorie L. J. E. Salvaggio.
Effects of Anti-E on total and Specific IgF levels in adult
Mice.
Int. Archs, Allergy appl. Immunol. 78: 51-56; 1985
4. Capron, Dessaint. Capron M. Joseph.
From Parasites to allergy: a second receptor for IgE
Immunology Today. vol 7 No. 1; 1986
5. Diamond L.S.
Techniques of axenic, cultivation of E. histolytica
Schaudinn 1903 and E. histolytica like amibae
J. parasitology 54: 1047-1056; 1968
6. Feinberg J. G.
Pinnal anaphilaxis; and additional anaphylactic site.
Nature, Lond 191: 712; 1961
7. Frick Oscar L.
Immediate Hypersensitivity
Edit. McGraw Hill
8. Gandhi B. M. Gupta H. Irshad M.
Cell mediated immunity in amoebic liver abscess
Journal of Tropical Medicine and Hyg. 99, 163-166; 1986
9. Geller M. Geller M.
Serum IgE levels in amoebiasis
Clin. Allergy 8: 565-567; 1978

10. Gil-Recansens M., Cats S., López Osuna M.
Increased Leukocyte histamine release by *E. histolytica*
antigens in patients with amoebic abscess of the liver.
Parasite Immunol. 6: 211-222; 1984.
11. Gleich J. Gerald and Loegering David A.
Immunobiology of Eosinophils
Ann Rev. Immunol. 2: 429-459; 1985
12. Halonen Marilyn., Dunn Anita M.
Effect of specific IgG on IgE induced systemic anaphylaxis
in the rabbit.
Immunology 56: 65-72; 1985
13. Harris W. G. Friedman, Bray R. S.
Serial measurement of total and parasite specific IgE in an
African population infected with *Entamoeba histolytica*.
Transactions of the Royal of Tropical Med. and Hyg. Vol.72
No. 4, 1978.
14. Inagaki N. Goto S.
Mouse ear PCA as a model for evaluating anti-anaphylactic
agents.
Int. Archs. Allergy appl Immun. 74: 91-92, 1984
15. Inagaki N. Goto S. Nagai H.
Homologous PCA in various strains of mice
Int. Archs. Allergy appl. Immunol. 81 (1): 58-62; 1986
16. Ishizaka Kimishige
T Cell Factors involved in the Regulation of IgE synthesis.
Progress in immunology ps 861-869; 1987
17. Ishizaka Kimishige
Regulation of IgE synthesis
Ann. Rev. Immunol. 2: 159-182; 1984
18. Jarret E., and Steward D.,
Potentiation of rat reaginic (IgE) antibody by helminth
infection.
Immunology 23, 749-755; 1972.

19. Knutti Muller, B. M, Stadler
Human IgE Synthesis in vitro
Allergy 41: 457-467; 1986
20. Kretschmer R.R.
Immunology of amebiasis
Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division)
1987
21. Landa L. Capin R.
Studies on cellular immunity in invasive amebiasis
Ann. Rev. Immunology 2: 412-420; 1985
22. Levi Francesca, Schaffer, Frank Austen, Howard R. Katz
T cell Derived Factors and Fibroblast derived Factors
Regulate the Growth and diferenciation of Mast cells.
Progress in Immunology VI pags 842-851; 1986
23. Levo Y et. al
Serum IgE Levels in patiens with liver disease
Ann. Allergy 47 (6) 456-459; 1981
24. Maddison Shirley E. Kagan Irving G.
Comparison of intradermal and serologic test for the
diagnosis of amefiasis.
The American Journal of Tropical Med. and hyg. Vol. 17 No.
4;1987
25. Marshall J. and Bell Eric
Induction of an auto anti IgE response in rats.
I Effects on serum IgE concentrations.
Eur. J. Immunol. Vol. 15: 272-277; 1987
26. Marshall J. and Bell Eric.
Induction of an auto anti IgF response in rats.
II Effects on mast cell populations.
Eur. J. Immunol. Vol. 17: 445-451; 1987.

27. Mecheri G. Peltre B.
Induction of PCA inhibitory factor in mice
Int. Archs appl. Immunol. 78: 290-299; 1985
28. Metzger Henry, Alcaraz Giseles. Robert Hohman.
The receptor with high affinity for immunoglobulin E.
Ann. Rev. Immunol 4: 419-470; 1984
29. Nakajima Toshiaru, Sarfati Marie,
Relationship between human IgE binding factors (IgE-BF)
and lymphocyte receptors for IgE.
The journal of immunology Vol. 139: No. 3 Aug; 1987
30. Ovary Z. Caiazza S. Kojima S
PCA reactions with mouse antibodies in mice and rats.
Int. Archs Allergy appl. Immun. 46: 16-21; 1975
31. Prouvost Danon, Binaghi R.
Reaginic antibody in adult and young mice.
Int. Archs. Allergy appl. Immunol. 38: 648-656; 1970
32. Prouvost Danon, Binaghi R.
Immunochemical Identification of mouse IgE
Immunol. Lond 23: 481-491; 1972
33. Revoltella R. Jayakar S. Tinelli M.
Parasite reactive Serum IgE antibodies in African
Populations.
Int. Archs. Allergy appl. Immunol. 62 (1) 23-33; 1980
34. Salata Robert, Martinez-Palomo
Patient Treated for Absces Liver amebiano.
35. Sauerbronn Celso M. Nelson
Susceptibility to cutaneous anaphylaxis in inbred strains of
mice.
J. Immunol. 112: (4); 1974.

36. Savanat T. Bunnag T.
Skin test for amebiasis
J. Trop Med. Hyg 22: 168-173; 1973
37. Savanat, Danal Bunnag, Tan Chongsuphajaisiddhi
Skin test for amebiasis: An appraisal
The American Journal of Tropical Med. and Hyg.
Vol. 22 No. 2; 1973
38. Usawattanakul W. Bramuan T. Nitaya T. Savanat T.
Mouse IgE response to an allergen from *Entamoeba histolytica*
Parasitology 683: 398-401; 1982
39. Estimation of Protein with Folin Ciocalteu reagent by the
method Lowry et al.
J. B. Chemistry 193: 265; 1951