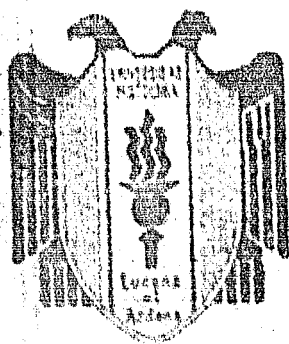


BIBLIOTECA FAC. DE QUIMICA



**ESTUDIO DE LAS HIDROLASAS EN ENTAMOEBAS
HISTOLYTICAS**

CRISANTA LAGUNES VIVERO

MEXICO, D. F.

1969



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.

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Escuela de Química

**Estudio de las Hidrolasas en Entamoeba
Histolytica.**

T E S I S

Que para obtener el título de :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :
CRISANTA LAGUNES VIVERO

*A mis padres:
Con infinito amor y gratitud.*

*A mis hermanos:
Con cariño.*

*A la memoria de la Srita. Dolores Echevarría
Esparza con mi eterno recuerdo.*

***A mi abuelo:
Con mucho cariño.***

A mi querida Abuelita.

***A mis maestros:
Con gratitud.***

***A la Srita. Q.F.B. Evangelina Lee y a la Srita.
Q.F.B. Emilia Fierro con mi agradeci-
miento por la dirección de esta tesis.***

Con profundo agradecimiento a los Sres. Dres. Luis Méndez, Subdirector General Médico del I.M.S.S.; Jesús Torres Gallardo, Jefe de Enseñanza del I.M.S.S.; Luis Landa, Jefe del Servicio de Gastroenterología del Hospital del C.M.N. del I.M.S.S.; Miguel Guerrero, Jefe del Depto. de Histología del Hospital General del C.M.N. del I.M.S.S., a la Srita. Q.F.B. Margarita de la Torre y al personal del laboratorio del Servicio de Gastroenterología del Hospital General del C.M.N. del I.M.S.S. sin cuya valiosa ayuda no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

Capítulo 1	Introducción.
Capítulo 2	Material y métodos.
Capítulo 3	Resultados.
Capítulo 4	Discusión.
Capítulo 5	Resumen.
Capítulo 6	Bibliografía.

Introducción.

En 1875 Lösch (1) descubrió amibas en un paciente con disentería y logró hacer la inoculación de estos parásitos en un perro; pero no fue sino hasta 1903 cuando Schaudinn- (2) hizo la diferenciación entre la *Entamoeba coli*, no patógena, y *Entamoeba histolytica*. La presencia de amibas en los abscesos hepáticos fue observada por Kartulis (3) en - 1886 y la existencia de los portadores sanos por Vincent - en 1909.

La *Entamoeba histolytica* presenta dos fases (4) una - fase vegetativa y una fase quística.

a) Fase vegetativa o trofozoíto.

En esta fase se pueden presentar dos formas, la forma denominada patógena que se encuentra en los enfermos de di sentería en estado agudo y la forma minuta que se encuen- - tra en los portadores sanos.

La forma patógena tiene un diámetro promedio de 25 mi cras aunque puede tener el doble de tamaño. Su citoplasma - está formado por un ectoplasma claro y por un endoplasma - finamente granuloso; en el endoplasma se pueden presentar - vacuolas alimenticias conteniendo eritrocitos y bacterias -

en varios períodos de digestión, o bien vacuolas claras. Las vacuolas alimenticias parecen formarse por invaginaciones de la membrana plasmática formándose una vacuola diferente para cada clase de partícula alimenticia (5). El movimiento es irregular y se basa en la formación de pseudópodos que pueden ser anchos y digitiformes; el tipo y rapidez del movimiento es variable ya que depende de varios factores como son la consistencia del medio ambiente, la temperatura, la edad del parásito, la variedad del mismo y las condiciones del huésped. Su alimento suele consistir en bacterias u otro material orgánico que toman del intestino.

Su núcleo es vesicular con un diámetro promedio de unas 4 micras y con un gránulo localizado centralmente que se llama cariosoma. El núcleo generalmente se encuentra cerca del punto en el que se está formando el pseudópodo aunque hay excepciones (6).

La forma minuta es mas pequeña que la anterior ya que su diámetro es de 20 micras, es poco móvil y sus pseudópodos son de formación lenta, en el endoplasma no se encuentran eritrocitos pero se ven vacuolas alimenticias, y su núcleo es a veces visible en fresco. El ectoplasma es poco diferenciado y poco refringente.

b) Fase quística.

Las formas patógenas de *Entamoeba histolytica* se encuentran en las lesiones del intestino grueso del huésped.

Después de un período de alimentación y reproducción (por división mitótica) las vacuolas desaparecen y la amiba --- adopta una forma redondeada; se empieza a formar una pared quística originándose la fase uninucleada denominada pre-- quiste (7).

Los quistes son pequeños ya que su diámetro es de 12- micras, su pared es fina con una sola capa hialina de unas 0.5 micras de diámetro que los hace poco resistentes a la desecación. Tienen en su estado maduro cuatro núcleos poco visibles en fresco, pero en sus diversos estadios pueden - tener 1, 2 o 3 núcleos. En el citoplasma se desarrollan -- uno o mas cuerpos cromatoides (8) en forma de barra que de saparecen al formarse los cuatro núcleos (9); en todos los estadios es frecuente encontrar inclusiones siderófilas, - voluminosas, con extremos redondeados.

Como las amibas son lábiles, mueren rápidamente en - condiciones adversas, la transmisión depende únicamente de los quistes, los cuales salen del cuerpo humano en las heces y se convierten en la fase infecciosa. El agua de bebí da, los alimentos, las moscas y las cucarachas son los ve- hículos mas comunes mediante los cuales penetran en el -- huésped, por lo cual deberán extremarse las precauciones - para evitar la infección.

Cuando el quiste es ingerido por un huésped, llega al intestino delgado o grueso en donde sale de su capa quisti ca; a esta fase se le llama desenquistación. Uno de los --

factores de posible importancia para la realización de esta fase es el potencial de oxidación-reducción (10). Una manifestación del proceso de desenquistación es el aumento de la movilidad de la amiba dentro del quiste. Se forman pseudópodos ectoplásmicos claros dentro del quiste que se mueven alrededor de la periferia; poco a poco la punta del pseudópodo va emergiendo de un poro en el quiste y se manifiesta como una pequeña hernia en el exterior. La forma como se hace la perforación no se sabe con exactitud pero posiblemente sea debido a una substancia citolítica.

La Entamoeba histolytica puede emigrar del intestino mediante la corriente sanguínea o los vasos linfáticos e invadir cualquier otro tejido. La localización mas común es en el hígado afectando principalmente el lóbulo derecho en donde la infección puede ser leve o bien desarrollarse un absceso. Estos abscesos también pueden ser localizados en la piel, pulmones o cerebro.

Muchos investigadores han estudiado la patogenicidad de las amibas pero todavía no ha sido suficientemente aclarada, parece ser sin embargo, que las bacterias tanto patógenas como no patógenas juegan un papel importante en la patogenicidad de la Entamoeba histolytica (11, 12). El papel de las bacterias puede ser simplemente físico suministrando un ambiente adecuado para los protozoarios, pero -- las investigaciones sobre el papel de las bacterias o el de otros asociados en cultivo con Entamoeba histolytica in

dican que la respuesta probablemente es mucho mas compleja

Se han reportado varias enzimas presentes en *Entamoeba histolytica* como son la amilasa (Hallman, 13; Hilker, 14 y Baernstein, 15); fosfomonoesterasas (Blumenthal, 16); glutaminasa (Nakamura y Goldstein, 17); esterasa (Hallman, 18) deshidrogenasa succínica (Seaman, 19; Kalra, 20); deshidrogenasa málica (Reeves, 21); aminotransferasa (Mohan Rao y Dutta, 22); aldolasa (Hilker y White, 23; Kalra, 24); gelatinasa (Nakamura y Edwards, 25). Pero la relación de estas enzimas con la patogenicidad de la *Entamoeba histolytica* - no está suficientemente estudiada.

Hallman (26), Hanoko (27), Harinasuta y Macgraith (28 29), Nakamura y Edwards (30), Seal (31) y Jarumilinta y -- Macgraith (32) han demostrado la presencia de la actividad proteolítica en la *Entamoeba histolytica*, sin embargo, los resultados obtenidos muestran que el caracter invasor de - la amiba no está en relación con esta actividad.

El presente trabajo se refiere a la posible existencia de enzimas hidrolíticas en la *Entamoeba histolytica* y su patogenicidad.

Las enzimas hidrolíticas o hidrolasas forman un grupo numeroso dentro de la clasificación enzimática adoptada -- por la Unión Internacional de Bioquímica. Tienen en común la capacidad de descomponer el sustrato en fragmentos de peso molecular menor, por fijación de agua entre los átomos cuya unión se rompe produciendo así su hidrólisis, en-

esta forma contribuyen a desdoblar alimentos como protef - nas, carbohidratos y grasas en fragmentos mas pequeños pa - ra ser metabolizados.

En la azifa se forman vacuolas alimenticias en donde está encerrado el alimento para su hidrólisis; de esta ma - nera los alimentos celulares provenientes de la hidrólisis atraviesan la membrana de la vacuola y pasan al protoplas - ma, mientras que los residuos no digeribles se eliminan al medio.

El grupo de las hidrolasas comprende mas de 200 enzi - mas pero el presente estudio se limita a las actividades - de la fosfatasa ácida, la fosfatasa alcalina y la B-glucu - ronidasa.

Fosfatasas.-

Se clasifican como fosfomonoesterasas cuya función es hidrolizar los ésteres orgánicos de fosfato, para liberar - iones fosfato inorgánicos. Se dividen en dos grupos princi - pales según el pH de actividad óptima, las fosfatasas áci - das con pH óptimo cercano a 4.9 y las fosfatasas alcalinas con pH óptimo entre 9.6 y 10.0

Las fosfatasas ácidas son activadas por los iones man - ganeso e inhibidas por cianuro de potasio, sulfato de zinc sulfato de cobre, fluoruro de sodio, arsenilato de sodio, - ácido tártrico y molibdato de amonio. En Histoquímica esta enzima se caracteriza entre otras cosas por ser rápidamen - te inactivada por el alcohol.

La fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis de va -- rios ortofosfomonoésteres, fosfamidias, etc. Se ha encontra do que la enzima es inhibida por pequeñas cantidades de -- cisteína (33), ácido taurocólico (34), glicina (35), albúmina (36); mientras que las sales de zinc, alanina y iones fluoruro casi no tienen efecto (37).

B-glucuronidasa.-

Pertenece al grupo de las glucósido-hidrolasas. Hidro liza una variedad de glucurónidos conjugados (38). Los pri meros estudios de esta enzima fueron los de Masamune (39)- y Oshima (40) pero su papel fisiológico no ha sido sufi -- cientemente aclarado. En años recientes la B-glucuronidasa ha llegado a ocupar un importante papel en la literatura - Bioquímica.

Fishman en 1940 opinó que la B-glucuronidasa jugaba - un papel importante en el cuerpo y mas tarde propuso la hi pótesis de que estas enzimas catalizaban la conjugación de estrógenos con ácido glucurónico (41).

Entre los inhibidores de esta enzima tenemos al ácido cítrico y algunos hidroxiaácidos (42), ácido sacárico y múcico (43), azúcar 1.4 lactona (44), heparina (45), ácido - glucurónico y iones cobre (46).

Entre los activadores de esta enzima (47) están el -- ácido desoxirribonucleico, albúmina, eulmotripsina, espermi na, espermidina, histina y ornitina (48).

Material y métodos.

Los primeros métodos para la producción de cultivos monoxénicos se basan en la destrucción de las bacterias -- contaminantes. Jacobs (49) en 1947 obtuvo el crecimiento de *Entamoeba histolytica* en cultivo monoxénico suprimiendo las bacterias mediante el uso de antibióticos. Phillips -- (50) en 1950 y en 1951 (51) describe el cultivo monoxénico de *Entamoeba histolytica* con *Trypanosoma cruzi*. Mas tarde Shaffer y col. (52-55) hicieron una serie de estudios que culminaron con la técnica Shaffer-Frye (56), en la cual se utiliza *Bacteroides symbiosus* como asociado. Este método -- fue simplificado por Reeves y col. (57) en 1957. En 1959 -- Mc.Dade y Shaffer (58) modificaron el medio introduciendo otras peptonas en lugar de tripticasa únicamente como se -- hacía hasta entonces. En 1960 Pan (59) hizo estudios para el cultivo de *Entamoeba histolytica* con hemoflagelados.

Entner en 1961 (60) y Entner y Most en 1965 (61) cultivaron *Entamoeba histolytica* en medio de Shaffer-Frye con teniendo maltosa en lugar de glucosa.

En 1965 Reeves y Ward (62) modificaron la técnica de Shaffer-Frye aumentando la masa de producción de amibas.

Diamond en 1968 (63) describe un método para el cultivo de *Entamoeba histolytica* en asociación con *Crithidia* o *Trypanosoma cruzi*.

El medio de cultivo utilizado en el presente trabajo es una modificación a los medios de Boeck-Drbohlav (64) y Shaffer-Frye (56), hecha en el Laboratorio del Servicio de Gastroenterología del Hospital General del Centro Médico - Nacional del I.M.S.S.

El medio sólido se prepara de la siguiente manera:

En un matraz Erlenmeyer con pedacería de vidrio se ponen los huevos necesarios para cada caso, agitando vigorosamente después de la adición de cada huevo para lograr una perfecta homogenización. Se le añade sangre humana fresca, desfibrinada, en proporción de 5 ml. para cada huevo. Se agita y se filtra a través de gasa doble; se reparte en tubos de ensayo pyrex de 150 X 16 mm. y se tapan. Se gelifican inclinados a 80 grados durante 30 min., se dejan reposar a la temperatura ambiente por 24 horas y se esterilizan a 15 lbs. durante 15 min. Tubos representativos de cada lote preparado se incuban a 37 grados por 24 horas para comprobar la esterilidad.

La fase líquida es una modificación a la técnica de Shaffer-Frye para cultivo monoxénico de *Entamoeba histolytica*.

Medio base:

Tripticasa (B.F.L.) 20 g/l.

Glucosa	10.0 g/l.
Cloruro de sodio	2.5 g/l.
Fosfato dipotásico trihidratado	2.0 g/l.
Acido tiamínico	1.5 g/l.

El ácido tiamínico o ácido 6 mercaptosuccínico se di suelve en agua y se neutraliza con solución de hidróxido - de sodio antes de añadirlo a los demás reactivos.

Se reparte el medio en tubos de ensaye pyrex de 16 X-125 mm. con tapón de rosca y se esteriliza a 15 lbs. 10 -- min. Se conserva en el refrigerador por mas de una semana. Cultivo de Bacteroides symbiosus.-

Bacteroides symbiosus crece e el medio base adiciona do de 0.2% de extracto de levadura (Difco).

La cepa de Bacteroides symbiosus utilizada en el pre- sente trabajo es la No. 12829 proporcionada por la Ameri - can Type Collection.

Siembra.-

La cepa de amibas utilizada en este estudio es la de- nominada T.A.H.M. procedente de material de absceso hepáti - co amibiano. Se sembró en el medio de cultivo ya descrito - y se incubó de 48 a 72 horas. Después de este período se - le hizo control de esterilidad para comprobar que no exis - tía contaminación. Para este control se utilizaron placas - de agar cerebro-corazón (Difco), sembrando en estría una - muestra representativa de cada tubo con crecimiento de ami - bas, llevando a incubar a 37 grados por 24 horas y obser -

vando la presencia de colonias. En caso de ser positivo es te examen se asechó el tubo del que procedía la muestra.

Para prevenir la presencia de bacterias contaminantes se le agregó al medio Penicilina "G" sódica y Sulfato de - Estreptomizina "S" (Farmacóuticos Lakeside).

Patogenicidad de la cepa.-

Se llevaron a cabo estudios de esta cepa inoculando - en Hamsters y cobayos. Se inoculó directamente en el hígado y peritoneo; se sacrificaron los animales a los 3, 5 y - 7 días y se hicieron estudios desde el punto de vista ma - croscópico e histológico. Se encontraron lesiones en todos los órganos fundamentales; en hígado, diafragma, peritoneo en general, ciego y colon correspondientes al grado 3 de - la clasificación propuesta por Jarumilinta que corresponde a: "Absceso localizado a la mitad de un lóbulo o mas de 5- abscesos de 1 a 2 mm." (65).

Los estudios histológicos corroboraron la presencia - de amibas en todas las lesiones, quedando así demostrada - la patogenicidad de la cepa.

Una vez teniendo los cultivos de 48 a 72 horas y li - bres de contaminación, se separan las amibas del bacteroi - das mediante centrifugaciones a baja velocidad y lavados - sucesivos con solución salina mantenida a 37 grados.

Teniendo ya el paquete de amibas se procede a hacer - la cuenta de las mismas siguiendo la técnica para cuenta - de glóbulos blancos en la cámara de Newbawer.

Métodos para la determinación de las actividades enzimáticas.-

Se utilizaron métodos bioquímicos y en algunos casos pudo corroborarse la actividad enzimática por métodos histoquímicos.

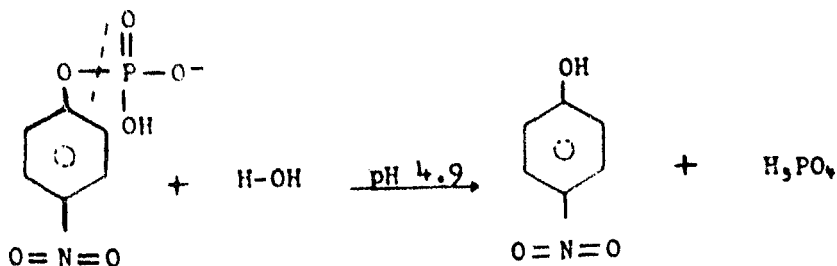
a) Métodos Bioquímicos.

Las amibas ya separadas del medio de cultivo y lavadas con solución salina a 37 grados, se homogenizan durante 20 minutos. Para obtener un concentrado de bacteroides se juntan los sobrenadantes de los lavados de amibas y se centrifugan a 4,500 r.p.m. Las determinaciones se hicieron tanto en el homogenado de amibas como en el concentrado de bacteroides.

1.- Determinación de Fosfatasa ácida.

Se siguió la técnica de Andersch y Szczypinski (66) - adaptada a micrométodo en el Laboratorio del Servicio de Gastroenterología.

Fundamento de la reacción.-



Reactivos empleados.-

Buffer-substrato:

Reactivo A. Disolver 21.008 g. de ácido cítrico en agua y agregar 200 ml. de hidróxido de sodio 1 N; aforar a un litro. A 200 ml. de esta solución agregar 100 ml. de ácido clorhídrico 1 N.

Reactivo B. Preparar una solución al 0.4% de p-nitro fenil fosfato disódico en ácido clorhídrico 0.001 N.

Mezclar partes iguales del reactivo A y del reactivo-B para obtener el buffer-substrato.

Procedimiento.-

En un tubo de ensaye para micrométodo se coloca:

Buffer-substrato 115 microlitros.

Enzima (concentrado de amibas o bacteroides) 5 microlitros.

Incubar 30 minutos a 37 grados.

Hidróxido de sodio 300 microlitros.

Se centrifuga y se lee a 415 milimicras.

Blanco de reactivos.-

Buffer-substrato 115 microlitros.

Incubar 30 minutos a 37 grados.

Hidróxido de sodio 305 microlitros.

Se centrifuga y se lee a 415 milimicras.

Testigo.-

Enzima 5 microlitros.

Incubar 30 minutos a 37 grados.

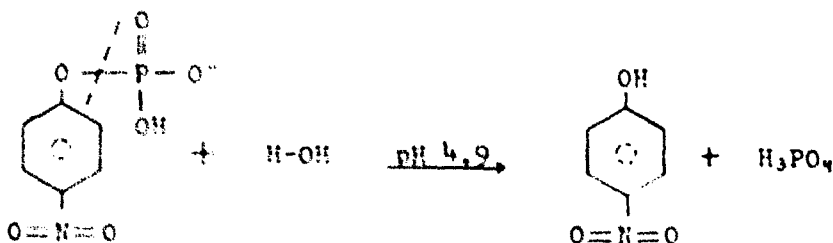
Hidróxido de sodio 415 microlitros.

Se centrifuga y se lee a 415 milimicras.

2.- Determinación de Fosfatasa alcalina.

Se utilizó la técnica de Bessey, Lowry y Brock (67) - adaptada a micrométodo.

Fundamento de la reacción.-



Reactivos empleados.-

Solución amortiguadora de glicina 0.4 M. a pH 9.6.

Substrato. Solución de p-nitro fenil fosfato (Nutritional-- Biochemical Corporation) 0.0135 M. equivalente a 2 mg/ml.

Solución de cloruro de magnesio.

Solución de hidróxido de sodio 0.4 M.

Procedimiento.-

En un tubo de ensayo para micrométodo se coloca:

Solución amortiguadora 100 microlitros.

Substrato..... 50 microlitros.

Cloruro de magnesio 50 microlitros.

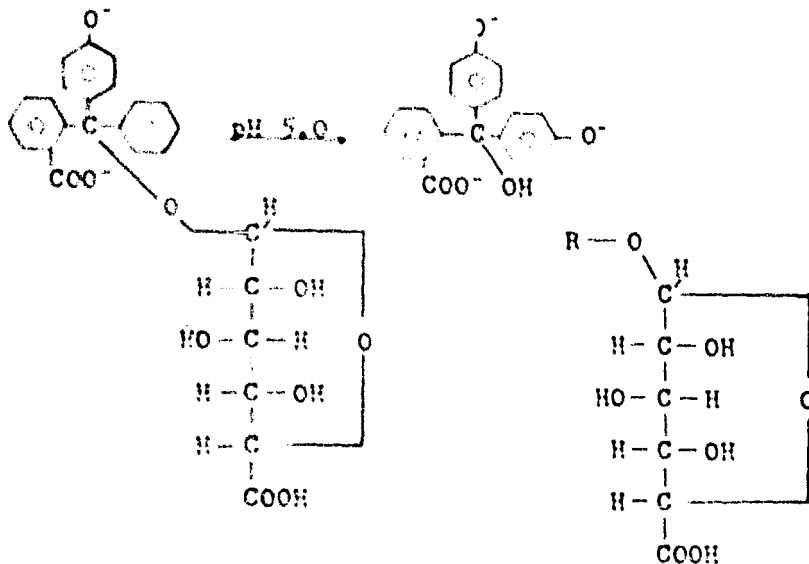
Enzima 5 microlitros.

Incubar 15 minutos a 37 grados.

Hidróxido de sodio 45 microlitros.

Centrifugar y leer a 415 milimicras.

3.- Determinación de β -glucuronidasa.



Reactivos empleados.-

Solución amortiguadora de ácido acético 0.07 M. a pH de -- 5.0.

Solución de ácido tricloroacético al 5%.

B-glucuronidato de fenolftaleína 0.01 M. a pH 7.0.

Solución de glicina alcalina.

Procedimiento.-

En un tubo de ensayo para micrométodo se coloca:

- | | |
|------------------------------|-----------------|
| Substrato | 10 microlitros. |
| Solución amortiguadora | 40 microlitros. |
| Enzima | 10 microlitros. |

Incubar 60 minutos a 37 grados.

- | | |
|-----------------------------|------------------|
| Acido tricloroacético | 60 microlitros. |
| Glicina alcalina | 180 microlitros. |

Se centrifuga y se lee a 540 milimicras.

4.- Determinación de proteínas.

Se utilizó la técnica de Cornall y Bardwill (69) adaptada a micrométodo en el Laboratorio del Servicio de Gastroenterología.

Reactivos empleados.-

Reactivo de Biuret.

Hidróxido de sodio al 10%.

Procedimiento.-

En un tubo de ensayo para micrométodo se coloca:

Reactivo de Biuret	200 microlitros.
Agua bidestilada	30 microlitros.
Muestra	20 microlitros.

Reposar a la temperatura ambiente por 30 minutos.

Blanco de reactivos.-

Reactivo de Biuret	200 microlitros.
Agua bidestilada	50 microlitros.

Testigo.-

Hidróxido de sodio al 10%	200 microlitros.
Agua bidestilada	30 microlitros.
Muestra	20 microlitros.

Se centrifuga y se lee a 540 milimicras.

La actividad enzimática se expresó en unidades internacionales/mg. de proteína que es la actividad específica.

La Comisión de Enzimas define a la Unidad Internacional como: "La cantidad de la enzima que cataliza la transformación de una micromola de sustrato por minuto bajo --

condiciones normales".

b) Métodos Histoquímicos para la determinación de actividad enzimática.

Se parte de una suspensión de amibas obtenidas de la misma forma que para los métodos Bioquímicos.

1.- Determinación de Fosfatasa Ácida.

Según la técnica de Pearse (70) modificada.

Reactivos empleados.-

Alfa naftil fosfato de sodio (Sigma).

Fast red I.T.R. (Matheson Coleman and Bell).

Procedimiento.-

Disolver 10 a 20 mg. de alfa naftil fosfato de sodio en 20 ml. de amortiguador acetato a pH de 5.0. Añadir aproximadamente 20 mg. de Fast Garnet G.F.C. o Fast red I.T.R.

Una gota de este reactivo se coloca con una gota de la suspensión de amibas y se incuba a 37 grados durante 30 minutos.

Resultado.-

Los sitios de actividad de la fosfatasa ácida en el cuerpo amibiano se colorean en café rojizo.

2.- Determinación de Fosfatasa alcalina.

Según la técnica de Burnstone modificada (71).

Reactivos empleados.-

P-nitro fenil fosfato.

N N' dimetil formamida (J.T.Baker).

Bicarbonato de sodio.

Tris hidróxido metil amino metano 0.2 M. a pH 8.3.

Fast red T.R.

Solución madre.-

Disolver 5 mg. de p-nitro fenil fosfato en 2 ml. de N N' dimetil formamida, agregar 2 ml. de agua destilada y bicarbonato de sodio suficiente para elevar el pH a 8. Se le agregan 60 ml. de agua y se afora a 1 l. con solución amortiguadora de tris hidróxido metil amino metano 0.2 M. a pH 8.3.

Procedimiento.-

A una gota de suspensión de amibas se le agrega una gota de una solución consistente en 4 ml. de solución madre y 4 mg. de sal de diazonio. En este caso utilizamos Fast red T.R. Se incuba por una hora y se observa al microscopio.

Resultado.-

Azocolorante rojo en el cuerpo amibiano indica sitio de actividad de la fosfatasa alcalina.

Resultados.

Para obtener datos representativos, los resultados -- fueron sometidos a un estudio estadístico (69).

Se determinaron los promedios aritméticos según la fórmula siguiente:

$$\bar{X} = \frac{\Sigma X}{N}$$

En donde:

Σ = suma de los valores encontrados y

N = número de determinaciones.

Se determinó la desviación estandar aplicando la siguiente fórmula:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(\bar{X} - X)^2}{N-1}}$$

En donde:

\bar{X} = promedio de las determinaciones.

X = valor de cada una de las determinaciones.

N = número de las determinaciones.

Tabla No. 1

Resultados de la determinación de proteínas por micro método en las fracciones de amibas y bacteroides.

No. de det.	No. de amibas por milímetro cúbico.	mg. de proteínas	
		amibas	bacteroides
1	3,000	4	7
2	1,800	3	4
3	1,000	12	6
4	1,800	4	6
5	2,950	6	8
6	3,350	6	7
7	1,750	3	5
8	1,200	8.5	6.5
9	1,450	7.5	13
10	4,950	5	4

Resultado estadístico:

$$\bar{X} = 5.9 \quad 6.65$$

$$\sigma = 3.64319 \quad .53842$$

Tabla No. 2

Resultado de la determinación de fosfatasa Ácida por micrométodo en la fracción de amibas.

No. de det.	micromol. por mililitro por minuto.	Actividad específica $\times 10^4$
1	.03666	916
2	.04641	1347
3	.03833	644
4	.08566	2141
5	.17333	2888
6	.29000	4833
7	.18666	6222
8	.09833	1156

Resultado estadístico:

$$\bar{X} = 2518.375 \times 10^{-4}$$

$$\sigma = 503.59741 \times 10^{-4}$$

Tabla No. 3

Resultados de la determinación de fosfatasa ácida por micrométopa en la fracción de bacteroides.

No. de det.	micrométopa por mililitro por minuto.	Actividad específica $\times 10^{-5}$
1	.00516	73
2	.00991	247
3	.00708	118
4	.01250	208
5	.01500	187
6	.01525	232
7	.01104	220
8	.01333	205

Resultado estadístico:

$$\bar{X} = 171.5 \times 10^{-5}$$

$$\sigma = 214.53506 \times 10^{-5}$$

Tabla No. 4

Resultados de la determinación de fosfatasa alcalina-
en la fracción de amibas.

No. de det.	Micromolas por mililitro por minuto.	Actividad específica $\times 10^{-5}$
1	.0075	187
2	.0018	15
3	.0050	166
4	.0016	32
5	.0040	66
6	.0040	66
7	.0010	16
8	.0021	24

Resultado estadístico:

$$\bar{X} = 75.7 \times 10^{-5}$$

$$\sigma = 21.33131 \times 10^{-5}$$

Tabla No. 5

Resultados obtenidos en la determinación de fosfatasa alcalina en la fracción de bacteroides.

No. de det.	Microcelas por mililitro por minuto.	Actividad específica $\times 10^{-8}$
1	.00010	58
2	.00043	13
3	.00041	10
4	.00200	50
5	.00190	16
6	.00080	10
7	.00050	8
8	.00160	24

Resultado estadístico:

$$\bar{X} = 23.625 \times 10^{-8}$$

$$\sigma = 5.7636 \times 10^{-8}$$

La actividad de la β -glucuronidasa no se pudo determinar ya que no se encontró ni en la fracción de amibas ni en la de bacteroides. Como en un trabajo previo en el cual se utilizaron trofozoitos cultivados en medio mixto, si se encontró la actividad de esta enzima (72), la ausencia de ella en el mismo sistema ensayado sugirió la presencia de un inhibidor de la enzima en el medio de cultivo.

Para investigar el inhibidor se diseñaron varios experimentos utilizando los diferentes componentes del medio monoxénico en el que se cultivó la Entamoeba histolytica, y como fuente de enzima se obtuvieron los trofozoitos cultivados en medio mixto.

El primer experimento diseñado fue utilizando medio de cultivo monoxénico.

No. de det.	1	1'	1B	2	2'	2B	3	3'	3B	4	4'	4B
Sol.amort.	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Enzima.	20	20	--	20	20	--	20	20	--	20	20	--
Substrato.	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Agua.	10	10	10	5	5	5	--	--	--	--	--	--
Medio de cultivo	--	--	--	5	5	5	10	10	10	20	20	20

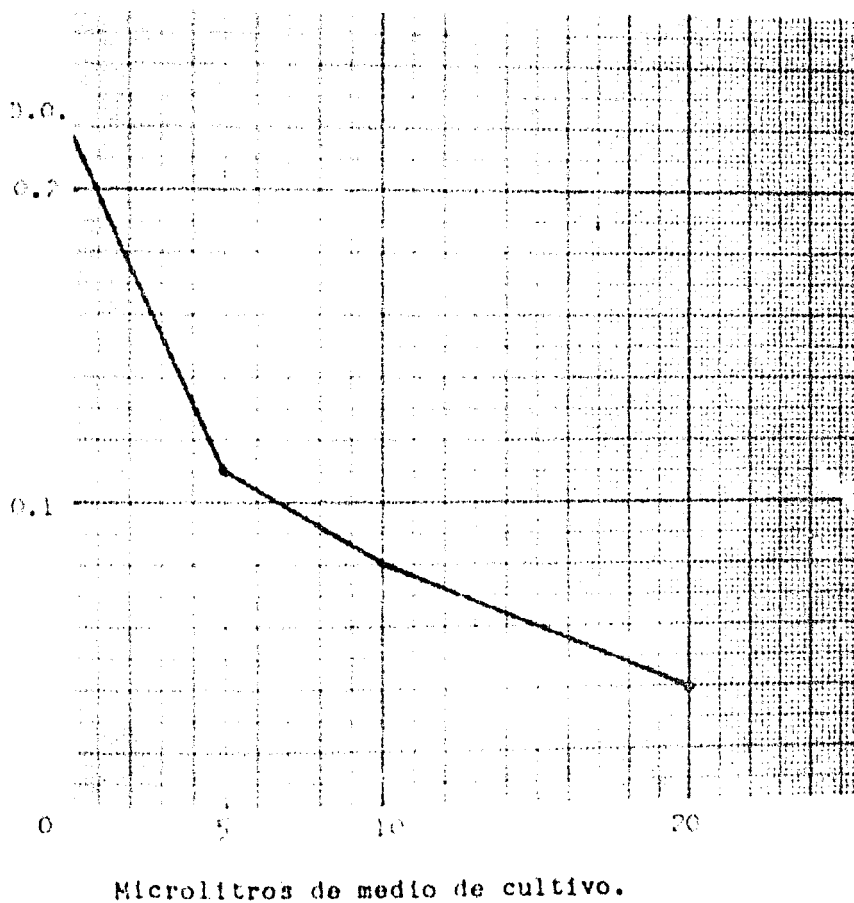
Incubar dos horas a 37 grados.

A.T.C.A.	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Enzima.	--	--	20	--	--	20	--	--	20	--	--	20
Glic.alc.	170	170	170	170	170	170	170	170	170	160	160	160

Los resultados se muestran en la gráfica No. 1

Gráfica No. 1

Experimento para demostrar la presencia de un inhibidor de la β -glucuronidasa en el medio de cultivo monoxénico.



Como se puede observar hubo una franca inhibición de la actividad de la enzima cuando se añadió al sistema enzimático el líquido del medio monoxénico; con el objeto de saber cual de los componentes del medio de cultivo tenía efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima se hicieron experimentos con ácido thiomálico, penicilina y estreptomizina.

Experimento con Acido thiomálico:

No. de det.	1	1'	1B	2	2'	2B	3	3'	3B	4	4'	4B
Sol.amort.	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Enzima.	20	20	--	20	20	--	20	20	--	20	20	--
Substrato.	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Agua.	10	10	10	5	5	5	--	--	--	--	--	--
Ac.thiomal.	--	--	20	--	--	20	--	--	20	--	--	20

Incubar dos horas a 37 grados.

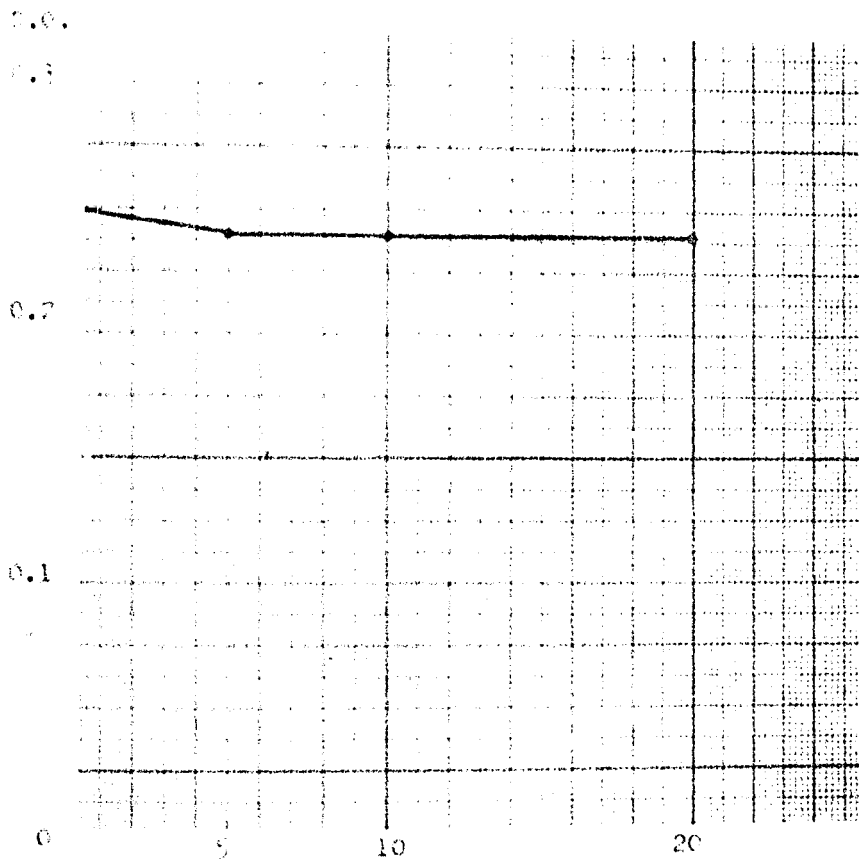
A.T.C.A.	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Enzima.	--	--	20	--	--	20	--	--	20	--	--	20
Glic.alc.	170	170	170	170	170	170	170	170	170	160	160	160

Resultados.-

Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica --
No. 2

Gráfica No. 2

Experimento con Acido tioránico para investigar la presencia del inhibidor de la β -glucuronidasa.



Microlitros de ácido tioránico.

Experimento con Penicilina.

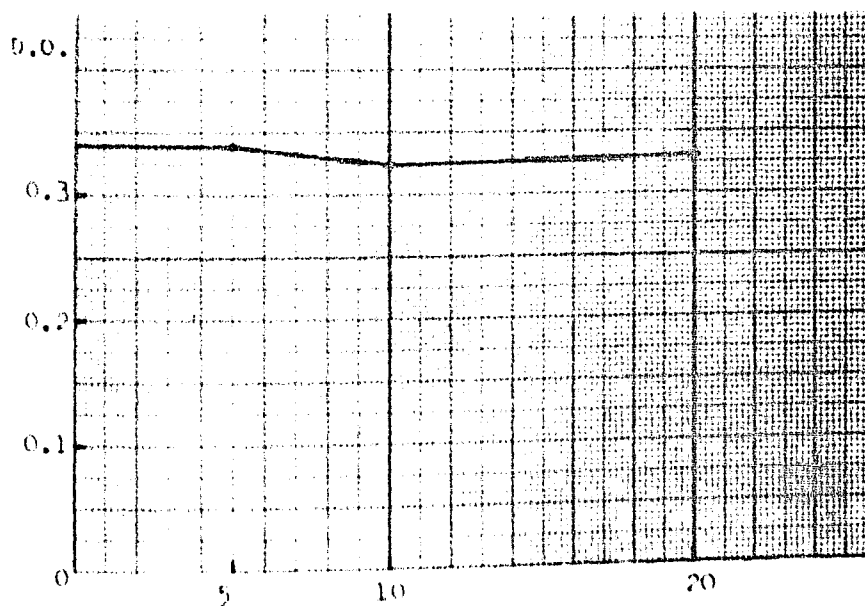
No de det.	1	1'	1B	2	2'	2B	3	3'	3B	4	4'	4B
Sol.azot.	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Enzima.	20	20	--	20	20	--	20	20	--	20	20	--
Substrato.	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Agua.	10	10	10	5	5	5	--	--	--	--	--	--
Penicilina.	--	--	--	5	5	5	10	10	10	20	20	20

Incubar dos horas a 37 grados.

A.T.C.A.	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Enzima.	--	--	20	--	--	20	--	--	20	--	--	20
Glic.alc.	170	170	170	170	170	170	170	170	170	160	160	160

Resultados.-

Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica No. 3.



Experimento con Estreptomicina.

No. de det.	1	1'	1B	2	2'	2B	3	3'	3B	4	4'	4B
Sol. amort.	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Enzima.	20	20	--	20	20	--	20	20	--	20	20	--
Substrato.	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Agua.	10	10	10	5	5	5	--	--	--	--	--	--
Estrep.	--	--	--	5	5	5	10	10	10	20	20	20

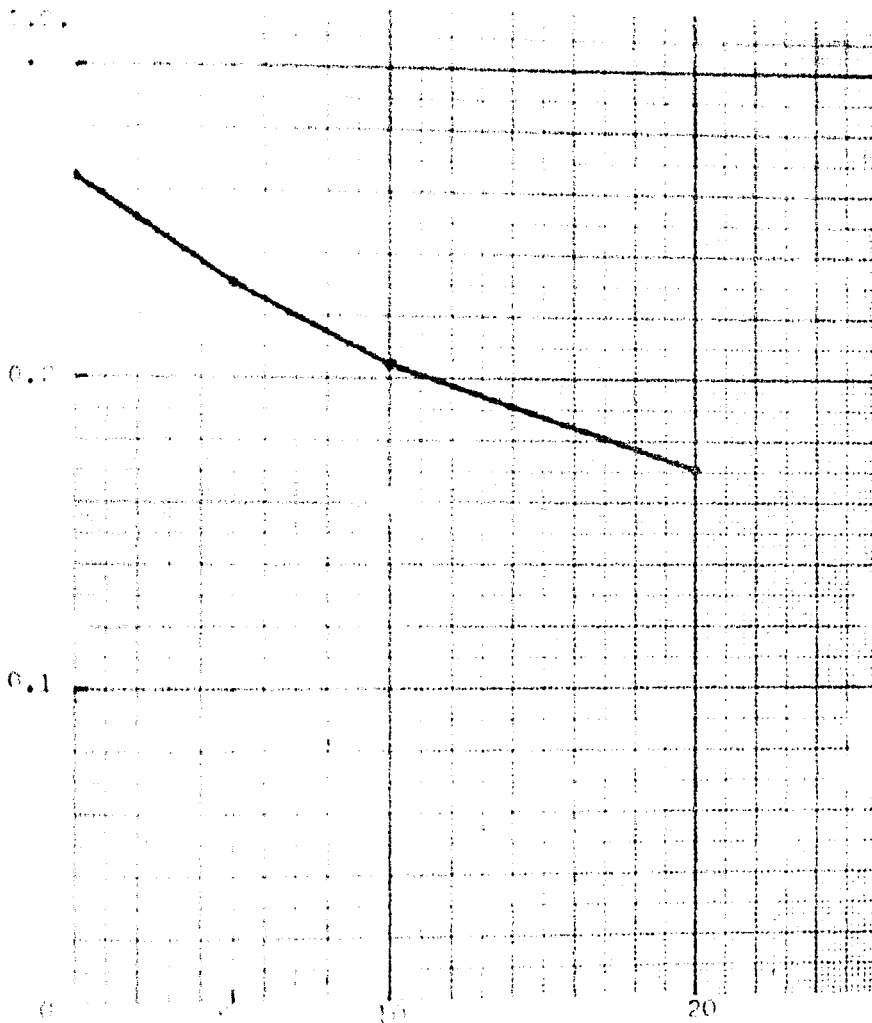
Incubar dos horas a 37 grados.

A.T.C.A.	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Enzima.	--	--	20	--	--	20	--	--	20	--	--	20
Glic. alc.	170	170	170	170	170	170	170	170	170	160	160	160

Resultados.-

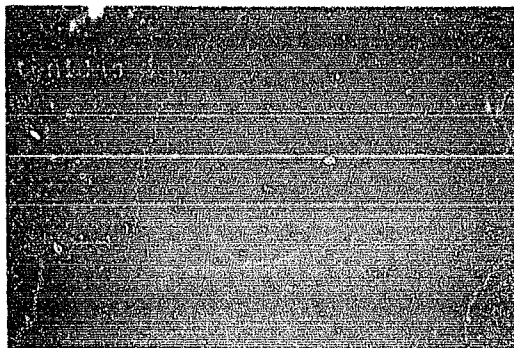
Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica --
No. 4

Gráfica No. 4



Microlitros de Estreptomina.

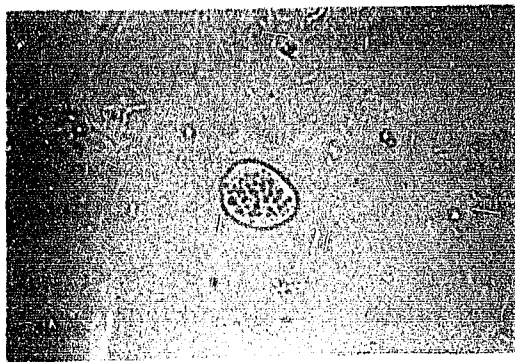
Resultados de las determinaciones Histoquímicas.
Fosfatasa Ácida.-



Los sitios de actividad de la fosfatasa ácida se encuentran en color café rojizo.

Fosfatasa alcalina.-

Los resultados obtenidos en fosfatasa alcalina por -- las técnicas histoquímicas no pueden considerarse definitivas, ya que no en todas las determinaciones estos resultados fueron reproducibles.



Los sitios de actividad de la fosfatasa alcalina se encuentran en color rojo.

discusión.

El método de centrifugación que se utilizó para obtener los trofozoitos con menor contaminación de bacterias - fue satisfactorio.

La determinación de proteínas en cada una de las fracciones fue la siguiente: en la fracción de bacterias (6.65 mg/ml) y en la fracción de amibas (5.9 mg/ml); ésta última corresponde a la suma de las concentraciones de proteínas de los trofozoitos y a la de bacteroides presente. Al tomar los valores de proteínas comparativos de las dos fracciones, la cantidad de bacteroides es bastante mayor en la fracción denominada bacterias que en la de amibas.

La actividad de fosfatasa ácida se encontró en las -- dos fracciones, en la de amibas y en la de bacterias; en -- la primera el valor promedio de la actividad específica -- fue de 7518×10^3 y en la fracción de bacterias fue de -- 171.5×10^3 , estos datos revelan claramente la presencia de la actividad de la enzima en los trofozoitos de la amiba ya que a pesar de la presencia de bacteroides en esta -- fracción, los valores de la actividad enzimática en la -- fracción concentrada de bacterias es mucho menor que la co

responsiente a los trofozoitos.

La actividad de fosfatasa alcalina también fue obtenida en las dos fracciones, y como en el caso anterior, la actividad de la enzima en la fracción de trofozoitos fue mayor que en la de bacteroides.

La actividad de β -glucuronidasa no se encontró en los trofozoitos cultivados en medio monoxénico, sin embargo, como en un trabajo previo (77) en el cual se cultivaron los trofozoitos en un medio mixto se encontró presente la actividad de esta enzima, ésto dio lugar a sospechar la presencia de un inhibidor en el medio de cultivo; se investigó el ácido entomálico, penicilina y estreptomycin, observándose que ésta última inhibía la actividad de la enzima.

Con los estudios histoquímicos se comprobó la presencia de fosfatasa ácida al presentar el citoplasma del trofozoito granulaciones rojas que corresponden a sitios de actividad de la enzima; estos hallazgos corroboran los resultados obtenidos con las técnicas bioquímicas.

Los resultados obtenidos por las técnicas histoquímicas con relación a la fosfatasa alcalina no fueron muy demostrativos, ya que no siempre se pudo observar la actividad, es decir, no fueron reproducibles; quizá por la poca actividad enzimática, ya que la diferencia entre la fosfatasa ácida y la alcalina es alrededor de 30 veces más.

Al parecer los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* -

están dotados de una gran capacidad metabólica como lo informan Harinasuta y col. (28); Neal (31) y Jarumilinta (32) así como en un trabajo previo del Servicio de Gastroenterología del Hospital General del Centro Médico Nacional (72) se informa la presencia de algunas actividades enzimáticas conectadas con varias vías metabólicas.

Hay varios autores que han pensado relacionar la patogenicidad del parásito con el tipo de enzimas presentes, - por ejemplo, los trabajos de Jarumilinta (32) y De Lamater y col. (74) pero los resultados obtenidos no son concluyentes.

En este trabajo se comprobó que la cepa patógena cultivada en medio monoxénico contiene la presencia de dos enzimas hidrolíticas como son las fosfatasas ácida y alcalina.

Resumen.

En el presente estudio se determinaron las actividades de fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y B-glucuronidasa en 8 muestras.

Las actividades enzimáticas fueron expresadas en actividad específica con el objeto de tener datos mas representativos.

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de -- fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina, ésta última en menor proporción que la anterior. No se encontró actividad de B-glucuronidasa ya que fue inhibida por la estreptomycin -- utilizada en el medio de cultivo para impedir la contaminación bacteriana.

Bibliografía.

- 1.- Mach, F. Massenhafte Entwicklung von Amöben in Dick -- darm. Arch. f. path. Anat. 65:196, 1875.
- 2.- Schaudinn, F. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundh.-Amte. 19:547, 1903.
- 3.- Kartulis, S. Zur Aetiologie der Dysenterie in Aegypten. Arch. f. path. Anat. 105:571, 1886.
- 4.- Soberón, G. Pelaez, D. Nociones de Parasitología Médica y Medicina Tropical. 1964. Francisco Méndez Oteo, Editor.
- 5.- Fletcher, K.A., Macgrath, H.G. and Jarumilinta, R. Elec -- tron Microscope Studies of Trophozoites of Entamoeba histolytica. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 56:496, 1962.
- 6.- Hopkins, D. and Warner, K. Functional Cytology of Entamoeba histolytica. Journal of Parasitology, 32:175, 1946.
- 7.- Craig and Faust, E.C. Clinical Parasitology. Seventh Edition. 1964. Lea and Febiger, Philadelphia.
- 8.- Hakansson, E.C., Buckner, J.F., and Downe, H.A. Observa -- tions on Chromatoid bodies in the Cysts of Entamoeba histolytica. U.S. Nav. Med. Bull., 34:478, 1936.
- 9.- Dobell, C. Researches on the Intestinal Protozoa of Mon -- keys and Man. I. General Introduction. II. Description of the whole life-history of Entamoeba histolytica in -- cultures. Parasitology, 20:357, 1928.
- 10.- Noble, E.R. y Noble, G.A. Parasitología. 1965. Segunda Edi -- ción. Editorial Interamericana.
- 11.- Phillips, B.P., Wolfe, P.A. and Bortges, I.L. Studies on -- the Amoeba-Bacteria Relationship in Amebiasis. II. Some -- concepts on the Etiology of the Disease. American Jour

Sal of Tropical Medicine and Hygiene,7:392,1958.

- 12.- Phillips, E.P., Wolfe, P.A., Rees, C.W., Gordon, H.A., Wright W.B. and Reynolds, J.A. Studies on the Ameba-Bacteria Relationship in Ameliasis. Comparative Results of the Intraoesophageal Inoculation of Germfree Monocontaminated and Conventional Guinea Pigs with *Entamoeba histolytica*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 4: 625, 1955.
- 13.- Hallman, F.A. and De Lamater, J.N. Demonstration of Amylolytic Activity in Cultures of *Entamoeba histolytica*. Experimental Parasitology, 2: 170, 1953.
- 14.- Miller, D.M., Sherman, W.F. and White, A.G.C. Starch Hydrolysis by *Entamoeba histolytica*. Experimental Parasitology, 2: 459, 1953.
- 15.- Baernstein, H.L., Rees, C.W., Beardon, L.V. Symbiosis in -- Cultures of *Entamoeba histolytica* and Single Species of Bacteria. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 3: 512, 1954.
- 16.- Blumenthal, H., Michaelson, J.F. and De Lamater, J.N. Some aspects of the Phosphomonoesterase activity of *Entamoeba histolytica* and Single Species. Experimental Parasitology, 4: 201, 1955.
- 17.- Nakamura, M., and Goldstein, L. Occurrence of Glutaminase in *Entamoeba histolytica*. Nature (London) 179: 1134, 1957.
- 18.- Hallman, F.A., Michaelson, J.F., and De Lamater, J.N. Esterase activity in *Entamoeba histolytica*. Journal of Parasitology, 41: 125, 1955.
- 19.- Seaman, G.R. Inhibition of the Succinic Dehydrogenase - of Parasitic Protozoans by an Arsono and Phosphono -- Analog of Succinic Acid. Experimental Parasitology, 2 - 366, 1953.
- 20.- Kalra, I.S., Sabri, M. I., Dutta, G.P. and Mohan Rao, V.K. Succinate Dehydrogenase activity of Trophozoites of *Entamoeba histolytica*. Indian Journal of Microbiology, 8: 108, 1968.
- 21.- Reeves, R.E., Bischoff, J.M. Classification of *Entamoeba* species by means of Electrophoretic properties of Amebal Enzymes. Journal of Parasitology, 54: 594, 1968.
- 22.- Mohan Rao, V.K. and Dutta, G.P. Transaminase Activity of *Entamoeba histolytica*. Indian Journal of Microbiology,

1963, 1966.

- 23.- Milker, D.M. and White, A.G.C. Some aspects of the Carbohydrate metabolism of *Entamoeba histolytica*. Experimental Parasitology, 9:539, 1959.
- 24.- Kalra, I.S., Dutta, C.P. and Mohan Rao, V.K. *Entamoeba histolytica*: Effect of Metal Ions, Metal Binders, Therapeutics, Antibiotics and Inhibitors on Aldolase Activity. Experimental Parasitology, 24:26, 1969.
- 25.- Nakamura, M. and Edwards, F.F. Enzymes of *Entamoeba histolytica*. I. Cellulase. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 100:403, 1959.
- 26.- Hallman, F.A., Michaelson, J.F. and De Lamater, J.N. The -- cultivation of *Entamoeba histolytica* in a defined medium. American Journal of Tropical Medicine, 30:363, -- 1950.
- 27.- Kaneko, M., Shiseichi-gaku-Zasshi, 5:92, 1950.
- 28.- Harinasuta, M., Chamlong and Macgraith, B.G. Proteolytic-Enzyme Activity of *Entamoeba histolytica*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 48:289, 1954.
- 29.- Harinasuta, M., Chamlong and Macgraith, B.G. The demonstration of Proteolytic Enzyme Activity of *Entamoeba histolytica* by the use of Photographic gelatin film. -- Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 52:508, -- 1958.
- 30.- Nakamura, M. and Edwards, F.R. Casease in *Entamoeba histolytica*. Nature (London) 103:397, 1959.
- 31.- Neal, R.A. Proteolytic Enzymes in *Entamoeba histolytica* Nature, 178:599, 1956.
- 32.- Jarumilinta, R. and Macgraith, B.G. Enzymes of *Entamoeba histolytica*. World Health Organization, Teherán 2-6 September, 1958.
- 33.- Schaffer, A.Z. physiol. Chem. 214:75, 1933.
- 34.- Poseou, S., Meade, F.C.: Heat inactivation in the study -- of human alkaline phosphatase. Ann. Int. Med, 62:1234, -- 1965.
- 35.- Rodansky, O. Mechanism of Inhibition of Phosphatase activity by Glycine. Journal of Biological Chemistry, 165

605, 1954.

- 36.- Kenneran, P. V., Bourke, G. M. and Jackson, W. P. V. Depression of serum alkaline phosphatase activity by human serum albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 213:19, 1955.
- 37.- Brill, T. A., Annesper, J. H. and Foy, A. C. Effect of cyanide fluoride and magnesium on serum phosphatase activity during hepatic damage. *Journal of Biological Chemistry* 192: 239, 1951.
- 38.- Fishman, W. H. Beta glucuronidase. *Advances in Enzymology* 14: 361, 1954.
- 39.- Masamune, H. Biochemical studies on carbohydrates. IV. On an enzyme which catalyses the hydrolysis of biosynthetic oxides of Glucuronic acid. *Journal of Biochemistry (Japan)* 19: 323, 1936.
- 40.- Oshima, S. Biochemical studies on carbohydrates. XII. On B-glucuronidase, second communication. *Journal of Biochemistry. (Japan)* 27: 361, 1936.
- 41.- Fishman, W. H. *The Enzymes*. Vol. I Part I. 1950. Sumner and Merrick, Ed. Academic Press, New York.
- 42.- Colowick, J. P. and Kaplan, N. O. *Methods in Enzymology*. -- 1955. Academic Press, Inc. Publishers, New York.
- 43.- Spencer, P. and Williams, R. T. Studies in Detoxication. 35 Spectro photometric Determination of B-glucuronidase using p-chlorophenylglucuronide as substrate. *Biochem J.* 48: 532, 1951.
- 44.- Levy, G. A. The preparation and properties of B-glucuronidase. 4. Inhibition by Sugar Acids and their lactones. *Biochemical Journal*, 52: 462, 1957.
- 45.- Mills, G. T., Paul, J. and Smith, E. E. P. Studies of B-glucuronidase. 2. The preparation and properties of three ox spleen B-glucuronidase fractions. *Biochemical Journal*, 53: 242, 1954.
- 46.- Matsushiro, T.: Inhibitory Effect of Bile Constituents upon Bacterial B-glucuronidase Activity. I. Effect of Normal Bile. *Tohoku J. Exp. Med.*, 80: 175, 1963.
- 47.- Bernfeld, P., Bernfeld, H. C., Nesselbaum, J. S. and Fishman, W. H. Dissociation and Activation of B-glucuronidase. *Journal of the American Chemical Society*, 76: 4872, 1954.

- 48.- Levy, G.A., and Marsch, C.A. Preparation and Properties of β -glucuronidase. Advances in Carbohydrate Chemistry 14: 181, 1950.
- 49.- Jacobs, I. The elimination of viable bacteria from cultures of Entamoeba histolytica and the subsequent maintenance of such cultures. American Journal of Hygiene, 46: 172, 1947.
- 50.- Phillips, B.F. Cultivation of Entamoeba histolytica -- with Trypanosoma cruzi. Science, 11: 8, 1950.
- 51.- Phillips, B.F. Comparative effects of certain species of Trypanosomidae on the growth of Entamoeba histolytica in the absence of bacteria. American Journal of Tropical Medicine 31: 290, 1951.
- 52.- Shaffer, J.G. and Frye, W.W. Studies on the growth requirements of Entamoeba histolytica. I. Maintenance of a strain of Entamoeba histolytica through one hundred transplants in the absence of an activity multiplying bacterial flora. American Journal of Hygiene, 47: 214, 1948.
- 53.- Shaffer, J.G., Walton, J.G., and Frye, W.W. Studies on the growth requirements of Entamoeba histolytica. II. Preliminary observations on the cultivation of Entamoeba histolytica in a modified thioglycollate medium. American Journal of Hygiene, 47: 222, 1948.
- 54.- Shaffer, J.G., Ryden, F.W. and Frye, W.W. Studies on the growth requirements of Entamoeba histolytica. III. The growth and multiplications of two strains of Entamoeba histolytica in a transparent medium without the addition of rice flour or other particulate matter and without demonstrable bacterial growth. American Journal of Hygiene, 47: 345, 1948.
- 55.- Shaffer, J.G., Riden, F.W. and Frye, W.W. Studies on the growth requirements of Entamoeba histolytica. IV. Further observations on the cultivation of Entamoeba histolytica and other intestinal Protozoa in a clear medium without demonstrable bacterial multiplication. Some modifications and simplifications of the medium. American Journal of Hygiene, 49: 127, 1949.
- 56.- Shaffer, J.G. Factors affecting the propagation of Entamoeba histolytica in vitro in the S-F medium and in tissue bearing substrate. Annals of the New York Academy of Sciences 56: 1033, 1953.

- 57.- Reeves, R.E., Mellink, R.E. and Frye, W.W. A modified Shaffer-Frye Technique for the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some observations on its carbohydrate requirements. *American Journal of Hygiene*, 66:56, 1958.
- 58.- Mc.Dade, J.J. and Shaffer, J.G. Studies on the growth requirements of *Entamoeba histolytica*. VI. A modification of the S-F technic which makes possible the utilization of peptides other than trypticase. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 8:540, 1959.
- 59.- Pan, C.T. Studies on the monoxenic cultivation of *Entamoeba histolytica* with hemoflagellates. *J. Inf. Dis.*, 106: 284, 1960.
- 60.- Estner, N. Genetics of *Entamoeba histolytica*: initial experiments. *Journal of Protozoology*, 8:131, 1961.
- 61.- Estner, N. and Mast, H. Genetics of *Entamoeba*: characterization of two new parasitic strains which grows at room temperature and at 37°C. *Journal of Protozoology*, 12:10, 1965.
- 62.- Reeves, R.E. and Ward, A.F. Large lot cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Parasitology*, 51:321, 1965
- 63.- Diamond, L.S. Improved method for the Monoxenic Cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba histolytica*-like Amebae with Trypanosomatids. -- *Journal of Parasitology*, 54:715, 1968.
- 64.- Boeck, W.C. and Drbohlav, J. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Hygiene*, 5:371, 1925.
- 65.- Jarumilinta, B. A simple method of inducing amoebic liver abscess in hamsters. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 60:139, 1966.
- 66.- Andersch, M.A. Szczyplinski, A.J. Use of P-nitro phenil phosphate as the substrate in determination of serum-acid phosphatase. *American Journal of Clinical Pathology*, 17:521, 1947.
- 67.- Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *Journal of Biological Chemistry*, 144:321, 1946.
- 68.- Talalay, P., Fishman, W.H., Huggins, Ch. Chromogenic substrates. II. Phenolphthalein Glucuronic acid as substrates.

- to for the assay of glucuronidase activity. *Journal of Biological Chemistry* 166:757,1946.
- 69.- Gornall, A.G., Bardwell, C.J. and David, M.M. Determination of serum proteins by means of the Biuret Reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 177:751,1949.
- 70.- Pearse, E.A.G. *Histochemistry Theoretical and Applied* - 1960. J. and A. Churchill, Ltd.
- 71.- Burnstone, M.S.J. *Histochem. Cytochem.* 6:87,1958.
- 72.- Lee, E.P., De la Torre, M., Palacios, O., Del Rio, C., and -- Landa, L. Enzymatic activities Related to the Intermediary metabolism of *Entamoeba histolytica*. Seventh --- Congress of Biochemistry, August, 1967, Tokyo, Japan.
- 73.- Jarumilinta, B. The enzyme systems of pathogenic protozoa including *Entamoeba histolytica* with reference to the basis of pathogenicity. Ph.D. Thesis Univ. Liverpool 1962.
- 74.- De Lamator, J. Michaelson, J.B., Hallman, F.A. and Blumenthal, H. An investigation into hyaluronidase as a factor in the mechanism of tissue invasion by *Entamoeba histolytica*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 3:1,1954.