

24, 28



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**INTERACCION ENTRE LOS ANTICUERPOS Y  
LA Entamoeba histolytica EN EL ABSCESO  
HEPatico AMIBIANO**

**T E S I S**

**IRENE CORREA LEMUS**

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

**1 9 8 7**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	8
RESULTADOS	15
DISCUSION	20
CONCLUSIONES	23
RESUMEN	24
BIBLIOGRAFIA	39

## INTRODUCCION

La amebiasis es un padecimiento infeccioso del hombre y de otros mamíferos producido por amibas de vida libre y particularmente por el protozoario Entamoeba histolytica. El ciclo de este parásito comprende dos estadios: el trófico o vegetativo, que es la forma móvil e invasora responsable de la sintomatología propia de la enfermedad y la quística que corresponde a la forma resistente e infectante causante de la transmisión y propagación de la amebiasis. El trofozoito inicialmente vive en la luz del intestino grueso alimentándose de bacterias y secreciones intestinales donde se transforma en quista durante el estado de comensal. A los individuos que albergan al protozoario en esta forma por tiempo prolongado, sin presentar manifestaciones clínicas, se les denomina portadores sanos o asintomáticos. Sin embargo cuando el trofozoito invade la mucosa intestinal se produce la amebiasis invasora (1,2,3), cuyas manifestaciones clínicas pueden ser benignas o graves. Dentro de las primeras se encuentran la disentería amebiana, que consiste en diarrea con moco y sangre (1). Entre las formas graves estan descritas la colitis fulminante (4), el ameboma del colon (5) y la tiflopendicitis (6). Cuando E. histolytica logra atravesar la barrera intestinal, llega a otros órganos y tejidos como pulmón (7), cerebro (8), piel (9), órganos genitales (10), y en particular al hígado donde produce una zona de necrosis conocida como absceso hepático amebiano (1,3,11), que se caracteriza por ser bacteriológicamente estéril (1,12). En la etapa temprana del absceso hepático se presentan signos vagos como malestar en la región hepática, seguida de fiebre, anorexia, sudoración, postración; más adelante se incrementa el dolor en la parte superior del cuadrante derecho del abdomen, el hígado a la palpación se siente aumentado de tamaño y blando (1,13). La amebiasis invasora es un padecimiento que puede llevar al individuos hasta la

muerte, ya que desafortunadamente en muchos de los casos los pacientes acuden al médico en fases muy avanzadas de la enfermedad, y a pesar de ser correcto el diagnóstico, el paciente ya no responde al tratamiento, presentándose entonces una serie de complicaciones que lo llevan a la muerte (1). Muchos pacientes han muerto por amebiasis sin que se haya hecho el diagnóstico correcto, hecho que ha quedado demostrado en estudios de biopsias postmortem (14). Sin embargo, si la amebiasis se diagnostica en forma oportuna en las etapas iniciales, es de fácil curación. El parásito tiene una distribución mundial, y la amebiasis invasora es más frecuente en las zonas tropicales y subtropicales con sanidad inadecuada -- (15). La infección se adquiere al ingerir quistes en el agua o en los alimentos contaminados preparados por individuos infectados con escasos hábitos de higiene (1,2,3,40,41). Los portadores asintomáticos juegan un papel fundamental en la transmisión así como las moscas y fomites (1).

La frecuencia de la amebiasis y en particular del absceso hepático amebiano en México es de las más altas en el mundo, particularmente en los países en vías de desarrollo en donde existen escasos hábitos de higiene, lo que constituye un índice fiel para valorar la prevalencia de este padecimiento en una área geográfica (16). En México durante 1969 el absceso hepático amebiano tuvo una -- incidencia del 1.6 al 2.1%, mientras que la amebiasis invasora se encontró de 4.7 - 5.7% en las autopsias realizadas en cinco hospitales generales (1,17). Los registros del Hospital General de la S.S.A. en el año de 1968, muestran que la amebiasis invasora ocupó el cuarto lugar como causa de muerte (19). Antes de 1970 la mortalidad por absceso hepático amebiano era de 9 - 12% (11,19); en la actualidad ha disminuido debido a métodos de diagnóstico más adecuados (20-28), así -- como a la introducción de medicamentos eficaces como el metronidazol (29-31). La amebiasis invasora además de ser una enfermedad grave capaz de matar al enfermo se desarrolla en un período relativamente corto, puede también transfor-

marse en un padecimiento crónico e incapacitar a individuos productivos con -- las consecuentes repercusiones económicas de la institución e inclusive en el país. Esto puede ser mejor observado de los datos obtenidos de 1443 pacien-- tes de absceso hepático, entre los cuales hubo una mortalidad del 17%, la estancia hospitalaria promedio fué de 48 días y la incapacidad total en el tra-- bajo correspondió en un promedio de 80 días (32). También se han hecho estudios epidemiológicos en otras partes del mundo. En Africa del Sur de 5087 pacien-- tes adultos con amibiasis invasora el 40% correspondió a amibiasis hepática y el 60% a la intestinal, mientras que las muertes ocasionadas por ambos tipos - de amibiasis fué de 1.9%. En 1976 la mortalidad por absceso hepático amibiano en Salisbury, Zimbabwa fué de 13.3%. En los Estados Unidos de Norte América, el índice de frecuencia de amibiasis obtenido por laboratorios de salud públi-- ca fue de 0.9% (1).

Los individuos infectados con E. histolytica responden produciendo anticuerpos detectables por diferentes técnicas (33-38), que son de utilidad en los estudios seroepidemiológicos para establecer la frecuencia de la - amibiasis en una población dada (3). En México destacan los estudios de Landa realizados en 7532 sueros de individuos adultos que mostraron una positiv-- dad de 5 - 6% (3.39). Esta cifra se incrementó a 8.45% cuando se usaron en - sueros de habitantes de una planicie costera del Golfo de México a finales de 1973 (40). Otra encuesta seroepidemiológica realizada en 1974 en 20,000 sue-- ros provenientes de 46 comunidades de diferente nivel económico mostró la pre-- sencia de anticuerpos amibianos en 5.95%. En la ciudad de México en 1974 el porcentaje de individuos con anticuerpos anti*amiba* fué de 1.68% en la zona re-- sidencial de San Angel y de 7.53% en la zona proletaria de Netzahualcoyotl --

Los estudios seroepidemiológicos efectuados en 1966 en Estados Unidos de Norte América revelan la presencia de anticuerpos antiambianos en el 4% del personal militar (42), mientras que en 3033 sueros del personal de un hospital de Arkansas fué de 1.1% y en 778 pacientes de un hospital para enfermos mentales de 12.8% (43). En 1966 en Brasil y Colombia se encontraron valores de 7.5 y 33% respectivamente (42). En 1971 el personal de un hospital en Africa del Sur mostró 53% de positividad (44).

Todos los estudios epidemiológicos indican que la amibiasis es un problema de sanidad relacionado principalmente con el nivel socioeconómico y los hábitos de higiene (39-41). Las infecciones ocurren en individuos de cualquier edad, aunque la población escolar es la más predispuesta (45,46). El absceso hepático tiene una mayor incidencia en adultos entre 20 y 60 años, con predominio del sexo masculino en una relación de 3:1 (17,46,47,48).

En el hombre, así como en los modelos experimentales estudiados, la respuesta inmune humoral en la amibiasis hepática se caracteriza por una rápida aparición de anticuerpos antiambianos circulantes principalmente de la clase IgG y en menor grado de IgM (33-38,49,50). El estudio de estos anticuerpos anti-Entamoeba histolytica in vitro ejercen un efecto citopatogénico bien definido sobre los trofozoítos de E. histolytica, efecto que puede ser neutralizado con antígeno amibiano. La destrucción rápida de los trofozoítos es llevada a cabo a través de la vía clásica del complemento (51-57). Sin embargo, los sueros de individuos sanos con serología negativa para E. histolytica también poseen un efecto citolítico, pero en estos casos se debe a la activación de la vía alterna del complemento llevada a cabo por la amiba (58-61). Se ha demostrado que animales a los que deliberadamente se les ha disminuido el complemento y posteriormente se les desafia intrahepáticamente con el protozoario, presentan

lesiones más severas (62).

También se ha descrito que la interacción de E. histolytica con anticuerpos policlonales in vitro, induce la polarización de los complejos -- receptor-ligando, hasta formar un casquete denso en la superficie, seguido del desprendimiento espontáneo de una porción de la membrana, sin alterar la viabilidad del parásito. La redistribución de estos complejos se lleva a -- cabo en presencia de una monocapa de anticuerpo, el área de la membrana celu-- lar donde se localiza el casquete polar corresponde a la región del uroide - (63-67). Esta propiedad puede contribuir a la supervivencia del trofozoito en el huésped durante la infección. Este fenómeno es difícil de correlacionar con el efecto citopatogénico descrito anteriormente, el cual está de acuerdo con los hallazgos clínicos en pacientes con absceso hepático amibiano que han curado y que presentan anticuerpos antiamiba en circulación por períodos prolongados (38). Generalmente estos pacientes regresan a las mismas condiciones de vida que favorecieron la enfermedad, sin embargo no se ha observado recidivas más que en un 0.29% en los casos estudiados durante cinco años. -- Estos pacientes han adquirido una inmunidad que los protege contra la amibiasis hepática (68).

Con el advenimiento de los cultivos de E. histolytica en medio axénico (69,70) y la disponibilidad de un modelo experimental de amibiasis -- invasora, se despertó el interés de investigar el efecto de la inmunización -- con antígeno amibiano en la protección contra la infección por E. histolytica. Los modelos experimentales han incluido hámsters adultos y lactantes, así -- como cobayos y recientemente primates subhumanos (71-81). En uno de los pri-- meros estudios, se demostró que los hámsters con absceso hepático amibiano -- tratados con metronidazol curaban adquiriendo resistencia al desafío intra--



hepático con trofozoitos de E. histolytica (74). Asimismo, la transferencia pasiva de suero humano con anticuerpos específicos a hamsters confiere protección al posterior desafío con cepas virulentas (75). Todos estos antecedentes han servido de base para los estudios de la inmunoprofilaxis con modelos experimentales. Las fracciones amebianas que se han utilizado como inmunógenos comprenden desde antígeno total crudo (71-73), antígenos solubles y particulados (80) y antígeno total deslipidizado (81). Estos inmunógenos han sido obtenidos de cultivos amebianos monoxénicos y axénicos (69,70). La resistencia adquirida a la amebiasis invasora tanto en los humanos como en los animales de laboratorio indica que la inmunidad tiene un papel fundamental en los mecanismos de resistencia a la enfermedad.

En relación a los estudios histopatológicos del abceso hepático amebiano, estos se han enfocado particularmente a caracterizar la evolución de la lesión hepática tanto en el humano como en los animales de laboratorio (82-86). Los reportes indican la ausencia de una reacción inflamatoria en la amebiasis invasora que padecen los humanos (82,83), pero los estudios en animales de experimentación señalan que en los estadios más tempranos de la enfermedad amebiana tanto intestinal como hepática se acompaña de una intensa reacción inflamatoria aguda (84-86). La formación de abceso hepático amebiano involucra tres fases consecutivas que son: inflamación aguda, formación de granuloma y una necrosis que avanza progresivamente. La primera fase se caracteriza por un gran número de leucocitos polimorfonucleares que rodean a los trofozoitos localizados centralmente; en la periferia de la lesión se localizan leucocitos e histiocitos lisados, los cambios degenerativos de los hepatocitos conducen a necrosis. En la segunda fase la necrosis aumenta así como la presencia de macrófagos y células epiteliales y se

desarrolla un granuloma bien organizado. La tercera fase constituye la fusión subsecuente de granulomas que conducen a una extensa necrosis que avanza progresivamente (84-86). Otros estudios histopatológicos del absceso hepático se han encaminado a la demostración de la actividad enzimática del parásito (87), a la morfología de E. histolytica en el absceso (88), al estudio del material fibroso que rodea la zona de necrosis (89) y a su mecanismo de acción en el hígado (90); sin embargo se desconoce la participación de las inmunoglobulinas específicas producidas por el hospedero en la lesión hepática y en particular su interacción con los trofozoitos de E. histolytica. Este aspecto es muy importante ya que como hemos mencionado anteriormente se ha reportado que cuando la amiba reacciona in vitro con anticuerpos específicos forma un casquete polar, mecanismo que se piensa puede estar involucrado en la evasión de la respuesta inmune (63,67).

Los objetivos de esta tesis son: conocer la afluencia de inmunoglobulinas a la lesión hepática y establecer como es su interacción con la amiba in situ. También es importante determinar si los trofozoitos en la lesión hepática presentan en su superficie los mismos determinantes antigénicos que se observan en las amibas de medio de cultivo, ya que de existir cambios estos pudieran ser relevantes como otro mecanismo de evasión del parásito.

## MATERIAL Y METODOS

Animales de experimentación. Se utilizaron hamsters dorados de Siria (Mesocricetus auratus), de ambos sexos, de 7 a 10 días de nacidos, mantenidos en el bioterio del IMSS y alimentados con productos comerciales para animales de laboratorio y agua ad libitum.

Trofozoitos de E. histolytica. Se emplearon trofozoitos de E. histolytica de la cepa HMI:IMSS obtenidos en cultivo axénico (69,70) en fa se logarítmica. Los cultivos de amibas se observaron al microscopio invertido y se seleccionaron los de óptimo crecimiento, esto es, aquellos donde las amibas se encontraban adheridas a las paredes del tubo, pero a la vez móviles. Estos tubos se colocaron en agua con hielo por espacio de 5 a 10 min, después de lo cual se procedió a invertir suavemente cada tubo para facilitar el desprendimiento de las células. Las amibas se cuantificaron en cámara de -- Neubauer y se midió la viabilidad mediante el colorante de azul tripano. El resto de las amibas se centrifugó 250 x g por 10 min. El paquete se resuspendió en el volumen necesario de solución salina isotónica (SSI, NaCl 0.15 M, - pH 7.0) para obtener la concentración deseada y se mantuvo en el hielo hasta su uso.

Antígeno de E. histolytica empleado en la contraelectroforesis (CIEF). Los tubos de cultivo axénico con trofozoitos cultivados durante 72 horas, se colocaron en agua con hielo de 5 a 10 min y se centrifugaron a 250 g por 10 min y el paquete de amibas se lavó tres veces con SSI y finalmente se resuspendió en un volumen mínimo de SSI para homogeneizarlo en un tubo de Potter Elvehjen por 5 min en frío. El antígeno total se centrifugó a --

1000 g por 10 min y la fase líquida se volvió a centrifugar a 15000 g por 20 min a 4°C. El sobrenadante se empleó como antígeno en la determinación de anticuerpos antiambianos por CIEF (33,34), a una concentración proteica de 2 mg/ml. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y col. (91). El antígeno se almacenó en alícuotas de 1 ml a -20°C hasta su uso.

Obtención de suero anti-E. histolytica en hamster. El esquema de inmunización para la obtención de suero anti-E. histolytica, consistió en la administración de hamsters adultos de una suspensión de  $2 \times 10^6$  trofozoitos previamente lavados y ajustados a un volumen de 0.5 ml e incorporados en 0.5 ml de adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories). Cada animal se inmunizó una vez por semana durante cuatro semanas. Las dos primeras semanas, se inocularon en cojinete plantar, intramuscular, y subcutánea 0.5, 0.25, y 0.25 ml respectivamente; las dos últimas se administraron por vía intramuscular y subcutánea en un volumen de 0.5 ml. Los animales se sangraron del plexo retro-orbital tres días después de la última inyección, para comprobar la presencia de anticuerpos específicos por CIEF. Una semana después de la última inmunización, se sangraron a blanco para obtener el suero hiperinmune.

Purificación de gamma globulina anti-E. histolytica. El suero de hamsters inmunizados con E. histolytica se diluyó al doble con SSI y la muestra se mantuvo en hielo y en agitación suave para evitar la formación de espuma. Se midió el volumen y se agregó gota a gota la misma cantidad de sulfato de amonio a pH 7.0; en estas condiciones precipita la gamma globulina (92). La suspensión se dejó una hora más en agitación y después se centrifugó en frío a 800 g durante una hora. El sobrenadante se desechó y el precipitado se redisolvió en SSI hasta tener una solución clara a la que se le --

ajustó el pH a 7.0. El procedimiento de precipitación con sulfato de amonio se repitió dos veces más. Por último, la gamma globulina se disolvió en solución salina y se dializó en PBS 0.01 M de pH 8.0, hasta que la reacción -- con cloruro de bario dió negativa, indicando la eliminación de sulfatos. La globulina se estandarizó determinando la concentración de proteínas por el -- método de Lowry y col. (91); además se evaluó su reactividad con el antígeno de E. histolytica por CIEF (33,34).

Anticuerpo monoclonal anti-E. histolytica. Se usó un anticuerpo monoclonal proporcionado por el Dr. Ortiz-Ortiz del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. Este anticuerpo fue preparado de acuerdo al -- método descrito por Köhler y Milstein (93) por fusión entre células de bazo -- de ratones inmunizados con trofozoítos de E. histolytica y células tumorales SP2, en una proporción de 6:1 respectivamente, por medio de polietilenglicol 1,000. La especificidad de este anticuerpo monoclonal ha sido demostrada y -- reportada previamente (94).

Determinación de la dosis de E. histolytica productora de absceso hepático amibiano. Para determinar la dosis de E. histolytica capaz de inducir absceso hepático amibiano, se inocularon intrahepáticamente cinco grupos de 10 hamsters cada uno, con  $1.0 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^4$ ,  $3.5 \times 10^4$ ,  $5.0 \times 10^4$  y  $1.0 \times 10^5$  trofozoítos respectivamente. Se dejaron evolucionar 15 días y después se sacrificaron para determinar la presencia de abscesos amibianos en el hígado. Un grupo control se inoculó con medio de cultivo.

Infacción intrahepática con E. histolytica. La región abdominal de cada animal fue desinfectada con alcohol. Los trofozoítos se administraron por punción percutánea en el hígado, mediante una jeringa de 1 ml con --

aguja del número 23 que contenía un tope aproximadamente de 8 mm para dejar el bical corto. La aguja se introdujo verticalmente debajo de la base del esternón y se inoculó 0.08 ml que contenían  $3.5 \times 10^4$  trofozoitos viables de E. histolytica (95). Los animales fueron sacrificados a los 3, 5, 8, 15, 19, y 31 días después de inoculados.

Determinación de anticuerpos anti-E. histolytica por CIEF en el suero de hamsters infectados intrahepáticamente. Los animales después de inoculados se sacrificaron a distintos días y de ellos se obtuvo la sangre que se dejó coagular y se centrifugó a 700 g por 15 min. El suero se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Para la determinación de anticuerpos anti-E. histolytica por CIEF, se utilizaron placas de vidrio de 10 x 8 cm cubiertas de 12 ml de agarosa (Sigmas) al 1.4% en amortiguador de veronal de pH 8.6, fuerza iónica 0.01. Una vez gelificada se hicieron dos hileras de pozos de 3 mm de diámetro aproximadamente; los de la izquierda para el anticuerpo y los de la derecha para el antígeno ambiano. La placa se colocó en la cámara de electroforesis que contenía el mismo amortiguador con fuerza iónica de 0.05 y pH 8.6. La interacción del amortiguador en la placa se hizo a través de tiras de papel filtro. La cámara se tapó y se aplicó una corriente de 8 miliamperes durante 45 min. Posteriormente la placa se lavó durante 24 horas, primero con SSI y después con agua. A continuación, la placa se tiñó con negro de anido al 1% (33,34) para revelar las bandas de precipitación antígeno-anticuerpo. Con el propósito de determinar el título de anticuerpo en el suero, se realizaron diluciones al doble. En cada determinación se incluyó un suero control positivo y un negativo.

Determinación de anticuerpos anti-E. histolytica por hemaglutinación pasiva (HI) en el suero de hamsters infectados intrahepáticamente. La determinación se hizo con el equipo comercial de Cellognost-Amebiasis --- (BEHRING), que usa eritrocitos formolizados cubiertos con antígeno amebiano. Los ensayos se llevaron a cabo usando diluciones del suero desde 1:8 hasta 1:2024 siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

Histología. A los 3, 5, 8, 15, 19, y 51 días después de la inoculación, se tomaron al azar cuatro animales que se sacrificaron para valorar la presencia de abscesos micro y macroscópicos en el hígado. De las porciones de hígado que presentaban indicios de lesión, o bien abscesos francos, se tomaron fragmentos de 0.5 cm<sup>3</sup> aproximadamente y se fijaron en formol al 10% durante 24 horas. Posteriormente, se lavaron con agua y se transfirieron a alcoholes graduales del 70%, 80%, 90%, 96% y absoluto, por espacio de una hora en cada caso. Luego se mantuvieron en xilol por 10 min y después en una mezcla de xilol y parafina en proporción 1:1 durante una hora. Toda la noche permanecieron en parafina y finalmente se incluyeron en esta última. Mediante un microtomo se hicieron cortes de 5 micras, los cuales se desparafinaron a 38°C por 15 min, y se sumergieron en xilol durante 10 min por dos ocasiones. Después de pasarlos por alcohol absoluto y del 96% por 5 min respectivamente, se tiñeron con hematoxilina-eosina para poner en evidencia a las amibas (96).

Determinación de Igs sobre la superficie de los trofozoitos de E. histolytica. La detección de las inmunoglobulinas del hospedero sobre las amibas del absceso se hizo utilizando un suero anti-hamster marcado con rodamina (Cappel, Malvern, PA), en dilución 1:20. Los cortes histológicos se cubrieron con el suero inmune y se incubaron por dos horas, se lavó dos veces -

con SSI y finalmente se observaron al microscopio de fluorescencia. Se usaron como controles negativos, los cortes de abscesos hepáticos ambianos de 3 días de evolución, tratados de la misma manera, período en el cual sabemos que no hay anticuerpos circulantes. Las preparaciones así tratadas se usaron también para determinar la presencia de epitopos en trofozoitos de E. histolytica, como se describe en el siguiente inciso.

Determinación de epitopos por medio de anticuerpo monoclonal -- sobre la superficie de los trofozoitos de E. histolytica en el absceso hepático. Para la detección de epitopos se utilizó el anticuerpo monoclonal anti E. histolytica de la clase IgG previamente descrito (94) y que a la vez se puso de manifiesto con un suero anti-IgG de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Cappel, Malvern, PA), en dilución de 1:20. Los cortes -- de 3, 5, 8, 15, 19, y 51 días se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti E. histolytica durante una hora y se lavaron dos veces con SSI. En seguida, se adicionó el conjugado fluorescente que se dejó actuar por una hora, lavándose nuevamente con SSI. Los cortes se observaron al microscopio de fluorescencia. El control negativo consistió en agregar a la preparación únicamente el anti-IgG de ratón-FITC.

Determinación de epitopos sobre la superficie de los trofozoitos de E. histolytica por medio de gamma globulina de hamster anti-E. histolytica. La gamma globulina de hamster que contenía anticuerpos anti-E. histolytica, - se dejó actuar sobre las amibas presentes en los cortes de absceso hepático - de 3, 5, 8, 15, 19, y 51 días por un lapso de una hora. Los cortes se lavaron dos veces con SSI y se agregó suero bovino anti-hamster (Cappel, Malvern, PA), diluido 1:20 marcado con FITC, por otra hora más. Las preparaciones se



lavarón inmediatamente y se observaron al microscopio de fluorescencia.

Reacción de trofozoitos de cultivo axénico con anticuerpo monoclonal anti-E. histolytica. Los trofozoitos de cultivo axénico de 72 horas de incubación se lavaron tres veces con SSI y se fijaron con formol al 10% por 5 min. Las amibas así tratadas a una concentración de 100,000 por 0.1 ml, se hicieron reaccionar por 15 min con 0.1 ml del anticuerpo monoclonal que contenía una concentración de proteína de 10,000 ug/ml; después se lavaron y se les adicionó 50 ul de suero anti-IgG de ratón marcado con FITC, en una dilución 1:20, durante 15 min. Posteriormente se lavaron, se colocaron en un portaobjetos y se observaron al microscopio de fluorescencia. El control negativo consistió de amibas procesadas de igual manera e incubadas únicamente con el conjugado.

Reacción de trofozoitos de cultivo con gamma globulina de hamster anti-E. histolytica. Las condiciones de reacción fueron iguales a las realizadas con el anticuerpo monoclonal. En este caso la reacción se puso de manifiesto con un suero anti-hamster marcado con FITC (Cappel).

## RESULTADOS

Dosis-respuesta de hamsters infectados con *E. histolytica*. La dosis respuesta realizada en los animales de experimentación mostró que el índice de absceso hepático y de muerte disminuyó en paralelo con la cantidad de amibas inoculadas. Así la inoculación intrahepática de  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^4$  amibas indujo absceso en todos los hamsters y una mortalidad del 80% y 60% respectivamente; la dosis de  $3.5 \times 10^4$  trofozoítos causó el 40% de abscesos y sólo una muerte; mientras que  $2.5 \times 10^4$  infectó el 50% de los hamsters sin causar muertes y  $1 \times 10^4$  fué inocua. Los datos se muestran en la Tabla I.

Las lesiones macroscópicas se identificaron como áreas bien circunscritas de material patológico de color blanco y de consistencia dura. El diámetro de las áreas varió de 1 a 30 mm; en algunas ocasiones fueron únicas y en otras múltiples. Las lesiones de dimensiones pequeñas se encontraron en zonas con apariencia sana y las de tamaño mayor, llegaron a invadir todo un lóbulo hepático (Fig. 1 y 2).

Infección intrahepática con la dosis seleccionada. De acuerdo a los datos anteriores, la dosis seleccionada para realizar todos los experimentos fué la de  $3.5 \times 10^4$  trofozoítos que indujo abscesos hepáticos en la mayor parte de los animales y que además permitió una sobrevida elevada. Los hamsters inoculados con esta dosis se sacrificaron después de 3, 5, 8, 15, 19, y 31 días.

Los animales infectados mostraron abscesos evidentes desde los 3 días; su tamaño fué de 1 a 3 mm. A los 15 días las dimensiones de los abscesos variaron desde 3 hasta 10 mm. Por otra parte, de los 19 a 31 días presen

taron abscesos grandes de 10 a 20 mm y que en algunos casos alcanzaron hasta 30 ó 40 mm; en estos últimos se llegaron a presentar metástasis y líquido ascítico.

Determinación de anticuerpos séricos por CIEF y HI. Los hamsters inoculados con  $3.5 \times 10^4$  trofozoitos de E. histolytica formaron anticuerpos - contra el parásito con la siguiente dinámica. De 3 a 5 días no se detectaron anticuerpos anti-amiba por CIEF ni por HI, mientras que en aquellos de 8 días, ya hubo presencia de absceso y títulos variables de anticuerpos en circulación; en algunas ocasiones un mismo suero fué positivo por CIEF y negativo por HI o viceversa. Sin embargo, cuando fueron positivos, siempre mostraron títulos - bajos de 1:2 por CIEF y de 1:16 por HI. En este mismo grupo algunos sueros - resultaron negativos por ambos métodos. A partir del día 15 todos los sueros tuvieron aumento en los niveles de anticuerpos, de 1:8 hasta 1:32 por HI y de 1:16 a 1:512 por CIEF. Estos títulos fueron similares en los grupos de 19 y 51 días tanto en el suero como en el líquido de ascitis de aquellos animales que lo formaron. Los sueros de animales de 19 y 51 días que no presentaron - absceso en hígado ni en otros órganos, también contenían anticuerpos circulan- tes, con títulos de 1:8 por CIEF. En los sueros de los animales usados como controles no se detectaron anticuerpos anti-amiba (Fig. 3).

Detección de IgG del hospedero sobre los trofozoitos presentes en el absceso. El estudio histopatológico de los hígados inoculados con -- E. histolytica realizados en los abscesos de 3 a 5 días de evolución no mos- -- tro inmunoglobulinas del hospedero sobre la superficie de los trofozoitos -- (Fig. 4). En aquellos de 8 días, con serología positiva, se encontraron ami- -- bas que al ser marcadas con anti-hamster-rodamina, dieron un puntilleo fluo- -- rescente fino sobre la superficie (Fig. 5). En algunos casos, no obstante la

presencia de anticuerpos y de pequeños abscesos, no se encontraron amibas -- sino un granuloma que contenía detritus. Los abscesos de 15 días se caracterizaron porque en la periferia de la lesión del 95 al 100% de las amibas se encontraban en mal estado o destruidas y con inmunoglobulinas del hospedero en su superficie, la cual se apreciaba como un puntilleo más denso (Fig. 6 y 7). A los 19 y 31 días, los abscesos fueron de mayor tamaño y las amibas interaccionaron de manera muy variable con las inmunoglobulinas del hospedero, observándose en el centro de la lesión algunos trofozoitos que sí reaccionaron con las inmunoglobulinas (Fig. 8, 9 y 10). Ahora bien, las amibas en los abscesos iniciales o de algunos días de evolución pero aún pequeños, reaccionaron con el anticuerpo del hospedero observándose destruidas o en mal estado. En tanto que, en el centro de las lesiones de los abscesos de tamaño --- grande las amibas se observaron rodeadas de una gran cantidad de detritus y no reaccionaron con las inmunoglobulinas del hospedero; aunque otros grupos de amibas en la misma lesión sí lo hicieron.

Detección de epitopos de E. histolytica presentes en el absceso hepático amibiano. El examen de los cortes de hígado de hamsters infectados con E. histolytica a diferentes intervalos y que se hicieron reaccionar con el anticuerpo monoclonal, indicó que se marcaban del 95 al 100% de las amibas presentes en las lesiones de 3 a 5 días de evolución; algunas conservando su integridad y otras fragmentadas, acompañadas siempre de detritus. Pero en todos los casos, al menos una porción del trofozoito reaccionó con el anticuerpo. Por lo tanto, las lesiones en esta etapa están constituidas por detritus, amibas semidestruídas, y amibas enteras. A los 8 días el anticuerpo monoclonal sólo reaccionó con aquellas amibas que no contenían en su superficie anticuerpos del hospedero. A los 15 días reaccionó en muy baja propor--

ción, mientras que a los 19 y 51 días marcó el 95% de los trofozoítos que no contenían inmunoglobulinas del hospedero (Fig. 11-13). El patrón de fluorescencia de las amibas fue generalmente de tipo periférico y en menor proporción homogéneo. El patrón periférico siempre estuvo presente en los trofozoítos íntegros localizados en el centro de la lesión, en tanto que el homogéneo correspondió tal vez a los trofozoítos deteriorados.

Cuando el mismo estudio se llevó a cabo usando un anticuerpo policlonal anti E. histolytica se observaron resultados similares. En todos los casos la gamma globulina policlonal reaccionó con un 95% de las amibas que no contenían inmunoglobulinas del hospedero en su superficie. El patrón de fluorescencia fue semejante al observado en el caso del anticuerpo monoclonal.

Detección de epitopes en amibas de cultivo. El tratamiento de trofozoítos de cultivo de la cepa HM1:IMSS con el anticuerpo monoclonal anti E. histolytica mostró un 95% de fluorescencia. Los patrones de fluorescencia encontrados fueron en un 80% de tipo periférico o en anillo circunscrito a la membrana de la amiba (Fig. 14); al 15% restante consistió de patrones diversos que abarcaron amibas con una, dos o tres zonas de fluorescencia, -- otras con aspecto de cascara de naranja, de fluorescencia polar casi desprendida de la membrana, de fluorescencia verde homogénea y otras más verde mate. Muy pocas amibas fueron negativas a las reacciones con el monoclonal.

La tinción de cultivos similares con gamma globulina policlonal anti- E. histolytica presentó resultados similares; la globulina reaccionó con el mismo porcentaje de las amibas de cultivo que el anticuerpo monoclonal observándose los mismos patrones de fluorescencia, con predominio del patrón

periférico.

## DISCUSION

Los trofozoitos de E. histolytica que se localizan en abscesos hepáticos presentan sobre su superficie inmunoglobulinas del hospedero, -- siempre y cuando ya existan en circulación niveles detectables de anticuerpo. Una vez que el anticuerpo antiambiiano se encuentra circulando y las amibas muestran globulina antiambiiana sobre su superficie, se puede apreciar en los cortes histológicos un gran número de amibas destruidas debido al efecto citopatogénico que el anticuerpo ejerce sobre los trofozoitos. -- Sin embargo, en periodos subsiguientes aparecen amibas que no contienen inmunoglobulinas sobre su superficie. Una posible explicación a este hallazgo es que las amibas destruidas reaccionen con el anticuerpo y bloqueen el acceso de éste a las amibas íntegras. Lo anterior se refuerza al observar -- detritus fluorescente en los alrededores del absceso.

Es de hacer notar que durante las etapas tempranas de la infección, cuando aún el anticuerpo no es detectable, se aprecia una moderada -- destrucción de amibas, este efecto puede ser ocasionado por la activación -- de la vía alterna del complemento provocada por las propias amibas (58-61). La dinámica general de formación de anticuerpos en los hamsters infectados no difiere del que se observa tradicionalmente con otros antígenos; es decir, los anticuerpos se empiezan a evidenciar después de 5 días de la infección, aunque los títulos son en general bajos; no obstante, se incrementan a medida que transcurre el tiempo.

En relación a los mecanismos de evasión de la respuesta inmune se ha mencionado que en amibiiasis podrían participar dos de ellos: la formación de casquetes polares y la variación antigénica. En relación al prim

ro, se ha reportado que cuando el anticuerpo antiambiiano reacciona in vitro con trofozoitos de E. histolytica, tiene lugar la formación de parches que confluyen formando un casquete polar, que finalmente se desprende. Estas -- observaciones han llevado a los autores a postular que este podría ser un mecanismo que la ameba utiliza para evadir la acción del anticuerpo (63-47). --

Nuestras observaciones in situ no apoyan este postulado, ya que no se observan estos casquetes polares en las amebas presentes en los abscesos hepáticos sino únicamente amebas destruidas cubiertas con inmunoglobulinas. Las -- diferencias en estos hallazgos pueden deberse a las diferentes condiciones -- experimentales. En los estudios in vitro relacionados con la inducción de -- casquetes polares se usan concentraciones elevadas de inmunoglobulinas que -- difícilmente llegan a alcanzarse in vivo; en cambio el efecto citopatogénico se ha realizado con suero de pacientes con absceso hepático amebiano (51-57), los cuales obviamente contienen anticuerpos a concentraciones fisiológicas -- normales. Además, si la formación de casquetes polares se realizara de manera regular, el efecto citopatogénico que se ha observado tanto in vitro como en estos estudios in vivo, no se llevaría a cabo. Es interesante mencionar -- que el fenómeno de migración de casquetes polares puede manifestarse por -- otros mecanismos no inmunológicos, por ejemplo con Concanavalina A (97). En cuanto a la participación del fenómeno de variación antigénica, nuestros resultados no apoyan esta hipótesis, ya que tanto in vitro como in vivo los anticuerpos monoclonales y los policlonales reaccionan con los trofozoitos de --

E. histolytica a diferentes estadios del padecimiento. Los estudios in situ indican que cuando las amebas localizadas en el hígado no reaccionan con el -- anticuerpo específico marcado con fluoresceína, es porque se encuentran cubiertas, con anticuerpo producido por el propio hospedero. Por otra parte, -- si la variación antigénica tuviera lugar tampoco se observaría el efecto cito



patogénico que tiene el anticuerpo específico sobre las amibas, ya que al cam  
biar los antígenos de superficie, se impediría el reconocimiento del anticuer  
po ya formado.

### CONCLUSIONES

Los resultados que aquí se presentan indican que después de la --  
inoculación intrahepática con E. histolytica, tiene lugar el establecimiento  
de una respuesta humoral con la aparición de anticuerpos séricos en algunos -  
de los animales tratados, a los 8 días de inoculados. A partir del día 15 --  
todos los animales tienen anticuerpos circulantes. La presencia de estos an-  
ticuerpos, correlaciona con su afluencia a la lesión hepática y su depósito -  
sobre la superficie de las amibas observadas en los cortes histológicos, en -  
donde se puede apreciar que la interacción del anticuerpo con las amibas pro-  
duce un efecto citopatogénico evidente. También correlaciona con la presen-  
cia de detritus fluorescentes alrededor del sitio inoculado. A este respecto  
podemos decir que si las amibas localizadas en esta zona no presentan inmu-  
globulinas del hospedero sobre su superficie, puede deberse a que el anticuer-  
po del hospedero es adsorbido o bloqueado por estos restos amibianos, evitan-  
do así su acceso a las amibas en proliferación. Sin embargo, estas amibas sí  
reaccionan con el anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína, lo que indi-  
ca que poseen los mismos epitopes específicos de E. histolytica, excluyendo -  
así la posibilidad de que tenga lugar una evasión de la respuesta inmune por  
mecanismos de variación antigénica o de formación de casquetes polares.

RESUMEN

En este reporte se describen estudios de fluorescencia realizados en un modelo experimental de absceso hepático amibiano, con el propósito de determinar si el anticuerpo producido por el hospedero infectado es capaz de reaccionar con las amibas presentes en el sitio inoculado. Los resultados indican que el anticuerpo del hospedero reacciona con las amibas presentes en la lesión hepática; que existe una relación directa entre el tiempo de la aparición de los anticuerpos y la presencia de globulina sobre los trofozoitos del absceso hepático. Nuestros hallazgos no apoyan los postulados de evasión de la respuesta inmune por las amibas debida a formación de casquetes polares o variación antigénica.

TABLA I

RESPUESTA DE HAMSTERS INOCULADOS INTRAHEPATICAMENTE CON  
DOSIS DIFERENTES DE TROFOZOITOS DE E. histolytica

Dosis	Absceso hepático ambiano	Mortalidad	Observaciones
$1.0 \times 10^5$	10/10	80%	Abscesos gran- des, metásta- sis y líquido de ascitis
$5.0 \times 10^4$	10/10	60%	Abscesos gran- des
$3.5 \times 10^4$	8/10	10%	Abscesos de ta- maño variable
$2.5 \times 10^4$	5/10	0%	Abscesos pequ- ños
$1.0 \times 10^4$	0/10	0%	
Medios de cultivo	0/10	0%	No hubo absce- so



Fig. 1. Hígado con dos abscesos amibianos de dimensiones pequeñas que corresponden a las zonas de color blanco.



Fig. 2. Hígado con múltiples abscesos de tamaño variable.

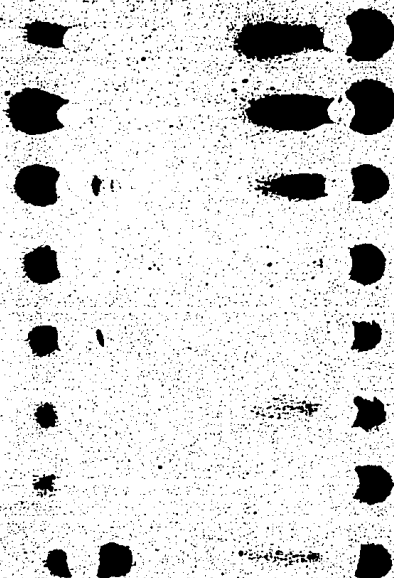
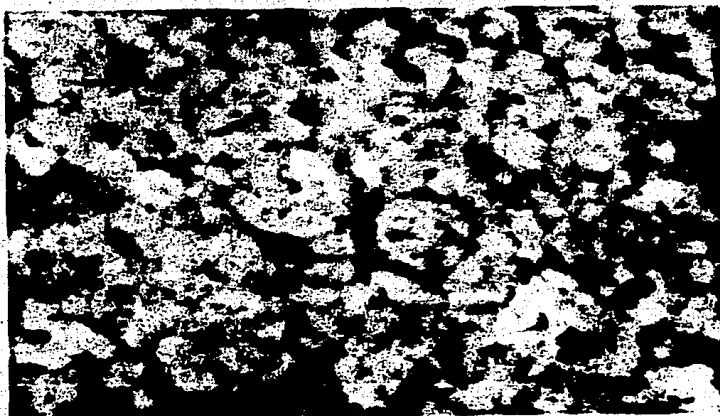
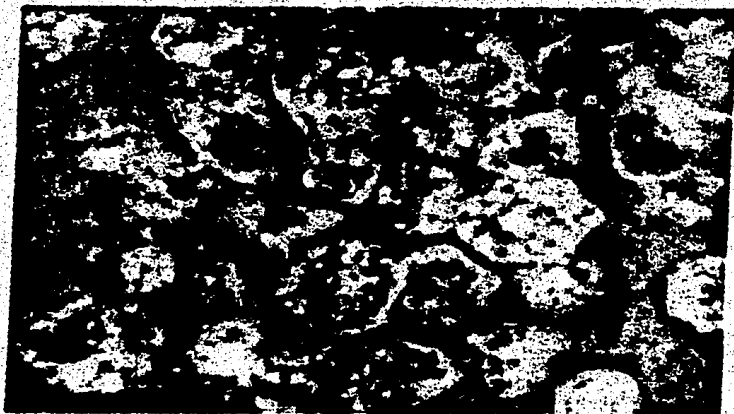


Fig. 3. CIEF de sueros de hamsters con anticuerpo séptico amibiano. Se observan bandas de precipitación cuando reacciona el anticuerpo presente en el suero de -- animales infectados con E. histolytica y el antígeno amibiano; las preparaciones se tiñeron con negro de anido.



**Fig. 4.** Absceso hepático amibiano de 5 días de evolución. Las amibas presentes en la lesión no muestran inmunoglobulinas del hospedero y en consecuencia no reaccionan con el reactivo de antihamster-rodamina.





**Fig. 5.** Absceso hepático amibiano de 8 días de evolución. Los trofozoitos presentes en la lesión reaccionan con el reactivo antihamster marcado con rodamina indicando la presencia de inmunoglobulinas del hospedero en su superficie. La fluorescencia se presenta como puntillado fino.

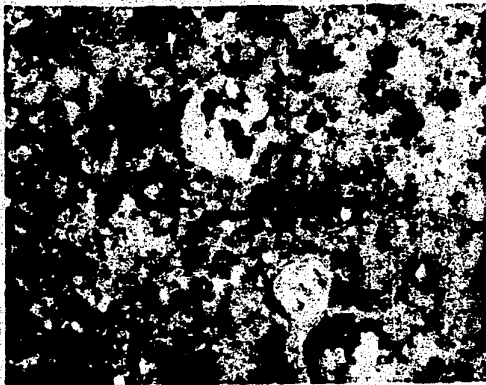
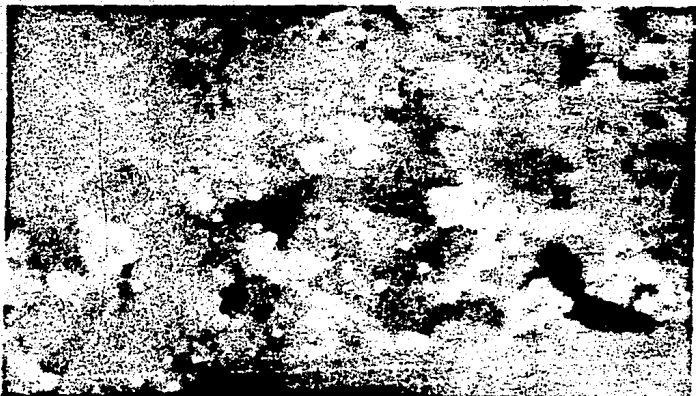
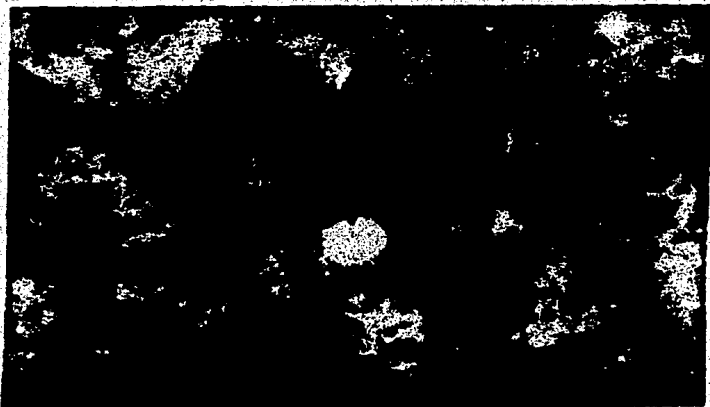


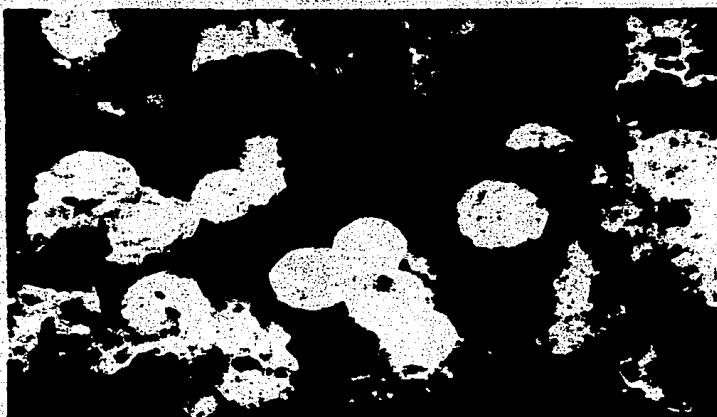
Fig. 6 y 7. Lesión de absceso hepático de 15 días de evolución. Las ambas en la lesión -- muestran inmunoglobulinas del hospedero sobre su superficie como lo revela el -- reactivo de antioglobulina de hamster fluorescente. La fluorescencia es en forma de un puntillito denso sobre los trofozoitos.



**Fig. 8. Abceso hepático amibiano de 51 días de evolución. -  
Se observan trofozoitos destruidos por efecto de las  
inmunoglobulinas del hospedero.**



**Fig. 9. Absceso hepático amibiano de 31 días de evolución. Las amibas no reaccionan con el reactivo de anti--globulina de hamster fluorescente, indicando que --no estan cubiertas por las inmunoglobulinas del --hospedero.**



**Fig. 10.** Corresponde a la misma lesión de la fig. 9 y aquí se aprecia que las amibas reaccionan con el anticuerpo monoclonal IgG contra E. histolytica.

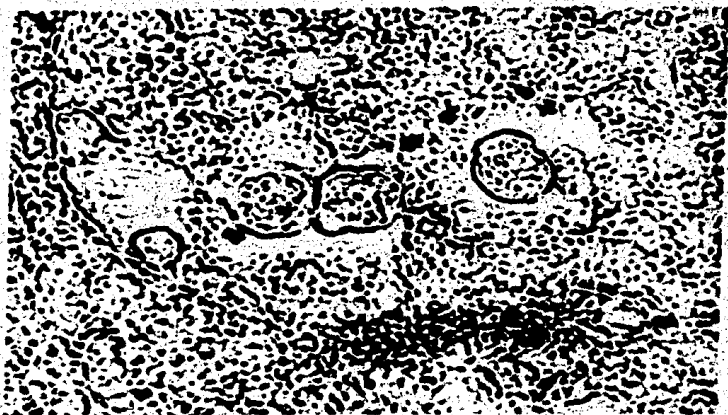


Fig. 11. Lesión de absceso hepático amibiano de 19 días de --  
evolución observada en contraste de fases. La prepa--  
ración muestra tres amibas íntegras rodeadas de de--  
tritus.



**Fig. 12. Corresponde a la misma lesión de la Fig. 11. Las amibas de esta lesión no presentan inmunoglobulinas del hospedero sobre su superficie.**

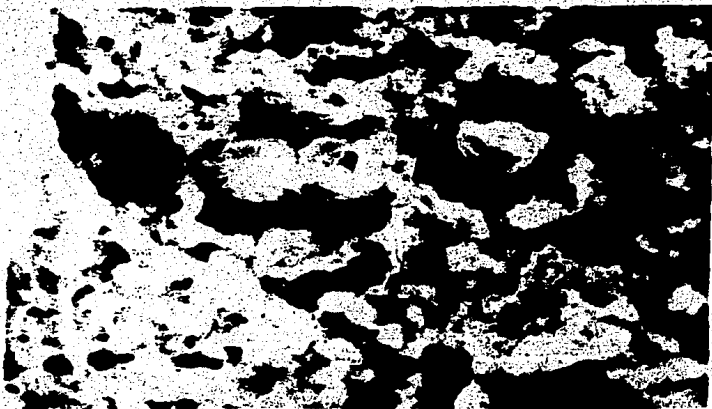
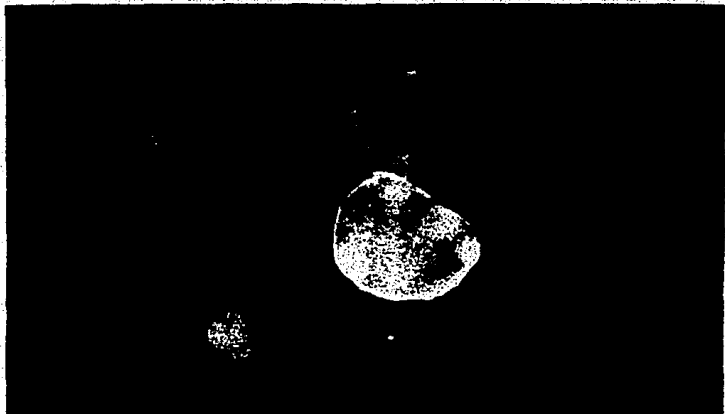


Fig. 13. Las mismas amibas de la fig. 11 que reaccionan con el anticuerpo monoclonal anti-E. histolytica; además se aprecia un material fluorescente que corresponde a los detritus de las amibas muertas.





**Fig. 14. Reacción de amibas de cultivo axénico con anticuerpo monoclonal que a la vez se evidencio con un antiradón marcado con FITC. Los trofosoftos presentan una fluorescencia periférica y en zona.**

BIBLIOGRAFIA

1. Martínez-Palomo, A. y Martínez Báez, M.: Selective primary health care: Strategies for control of diseases in the developing world. X. Amebiasis. Rev. Dis. 5: 1093, 1983.
2. Kretschmer, R.: Immune phenomena in amebiasis: Surv. Immunol. Res. 3: 1, 1984.
3. Ortiz-Ortiz, L. y Avella, L.M.: Respuesta inmune en infecciones por Entamoeba histolytica. Inmunología (España) 3: 5, 1984.
4. Godínez, C., Quijano, M., Jurado, J., Hernández, F. y Alvarez-Cordero, R.: Tratamiento quirúrgico de la colitis amebiana fulminante. Arch. Invest. Med. (Méx.) 1: s 237, 1970.
5. Cervantes, F.L., Sánchez, M.E., Santillán, J.M. y Martínez M.C.: Tratamiento médico del ameboma del ciego y colon ascendente. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: 427, 1971.
6. Guarner, V., Jurado, J., Baz-Díaz, L.G. y Martínez-Toro, N.: Tiflopendicitis amebiana. Arch. Invest. Med. (Méx.) 1: s 217, 1970.
7. Hakim, M.A. y Higazi, A.M.: Bronchopulmonary amoebiasis. Dis. Chest. 6: 1, 1968.
8. Lombardo, L. y Flores-Barroeta, F.: Amebiasis invasora cerebral. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: s 361, 1971.
9. Macotela-Ruiz, E.: Amibiasis invasora cutánea. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: s 373, 1971.
10. Garcia-Sainz, M., Silva-Artiaga, R. y Dela Huerta, R.: Amibiasis de órganos genitales en ambos sexos. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: s 367, 1971.

11. Elsdon-Daw, R.: The epidemiology of amoebiasis. *Adv. Parasitol.* 6: 1. 1968.
12. López-Mora, G., Escobedo-Salinas, A., Ochoa-Benavides, E., y Bautista-O'Farril, J.: Estudio bacteriológico en el absceso hepático en pacientes y en hamsters. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 1: s 21, 1970.
13. Krogstad, D.J.: Amebiasis and amebic meningoencephalitis. *En Cecil Textbook of Medicine* (J.B. Wyngaarden y L.H. Smith, ed.) 17th Ed. W.B. Saunders Company, Filadelfia, 1985. pp. 1799-1801.
14. Cervantes, F., Stoopen, M. De Stoopen, V.B., Flores-Barroeta, F. y González-Montesinos, F.: Porque no se diagnostican todos los abscesos hepáticos en nuestro hospital? *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 1: s 231, 1973.
15. Martínez-Báez, M.: Es la amibiasis una enfermedad tropical? *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 2: s 161, 1971.
16. Sepúlveda, B.: Introducción al seminario sobre amibiasis. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 1: s 5, 1970.
17. Alvarez-Alva, R. y de la Losa-Saldivar, A.: Frecuencia del absceso hepático amibiano en hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social de la República Mexicana. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 2: s 327, 1971.
18. Ridaura, S.C. y López, D.C.: Análisis de la mortalidad en el Hospital General de México, S.S.A. *Rev. Méd. Hosp. Gral. (Méx.)* 31: 259, 1968.
19. Las-Ramos, A.F., González-Montesinos, F., Landa, L. y Sepúlveda, B.: Estudio comparativo de las drogas utilizadas en el tratamiento del absceso hepático amibiano agudo. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 1: s 213, 1970.
20. Stoopen, M., Elizondo, L. y Landa, L.: Estado actual del diagnóstico radiológico en la amibiasis. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 3: s 387, 1972.

21. Perches, A. y De León, A.: El tiempo de resolución centellográfica del absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: s 401, 1971.
22. Cuarón, A., Gordon, F., y Landa, L.: La evolución de la centellografía en el diagnóstico del absceso hepático amibiano: Arch. Invest. Med. (Méx.) 3: s 403, 1972.
23. Gordon, F., Muñoz, R. y Treviño, H.: Estado actual de la centellografía hepática. Arch. Invest. Med. (Méx.) 13: s 323, 1982.
24. Segovia, F., Muñoz, R., Treviño, H. y Landa, L.: Evaluación a largo plazo de casos de amibiasis invasora del hígado. Arch. Invest. Med. (Méx.) 13: S307, 1982.
25. Bautista-O'Farril, J., Guarner, V., Díaz-Lombardo, G., Alvarez-Cordero, R., Hidalgo, F., y Godínez-Oropesa, C.: Cirugía de la amibiasis invasora. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: s 437, 1971.
26. Cordero-Alvarez, R., Bautista-O'Farril, J., Godínez-Oropesa, C.C., Guarner, V., Gómez-Garza, R. y Tercero-Estefan, F.: Estado actual del tratamiento quirúrgico de la amibiasis invasora. Arch. Invest. Med. (Méx.) 4: s 251, 1973.
27. Guarner, D.V.: Evolución de los conceptos en el tratamiento quirúrgico de la amibiasis invasora del hígado. Arch. Invest. Med. (Méx.) 5: s 549, 1974.
28. Bautista, J.: Tratamiento quirúrgico de las complicaciones de la amibiasis invasora. Arch. Invest. Med. (Méx.) 9: s 411, 1978.
29. Cervantes, L.F., González-Montesinos, F., Landa, L. y Sepúlveda, B.: Estudio comparativo de las drogas utilizadas en el tratamiento del absceso hepático amibiano agudo. Arch. Invest. Med. (Méx.) 1: s 213, 1970.

30. Lands, L., Ferches, A., De León, A. y Sepúlveda, B.: El tratamiento del absceso hepático amibiano agudo con metronidazol. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: s 421, 1971.
31. Cervantes, L.: Tratamiento médico de la amibiasis. Arch. Invest. Med. (Méx.) 3: s 415, 1972.
32. Sepúlveda, B.: El problema de la amibiasis hepática. Rev. Méd. IMSS 3: 1, 1964.
33. Sepúlveda, B., Lee, E., De la Torre, M. y Lands, L.: El diagnóstico serológico de la amibiasis invasora con la técnica de la inmunoelectroforesis cruzada. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: s 263, 1971.
34. Sepúlveda, B., Aubanel, M., Lands, L. y Velázquez, G.: Avances en la técnica de contraelectroforesis para el estudio serológico de la amibiasis. Arch. Invest. Med. (Méx.) 3: s 363, 1972.
35. Sepúlveda, B.: Reacciones de hemaglutinación con antígeno amibiano autógeno en amibiasis invasora. Arch. Invest. Med. (Méx.) 1: s 111, 1970.
36. Milgram, E., Healy, G.R. y Kagan, I.G.: Studies on the use of the indirect hemagglutination test in the diagnosis of amebiasis. Gastroenterol. 50: 645, 1966.
37. Nos, H.J. y Van-Den Eij, K.A.A.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of amebiasis. En Proceedings of the International Conference on Amebiasis. (B. Sepúlveda y L.S. Diamond, ed.) Instituto Mexicano del Seguro Social, México 1976. p. 721.
38. Trujillo, J., Segovia, E., Callegos, J. y Resano, F.: Detección a largo plazo de anticuerpos antiamibianos por contraelectroforesis y hemaglutinación indirecta. Arch. Invest. Med. (Méx.) 13: s. 311, 1982.

39. Landa, L., Aubanel, M., Segovia, E. y Sepúlveda, B.: Seroepidemiología de la amibiasis en adultos. Arch. Invest. Med. (Méx.) 3: s 377, 1972.
40. Gutiérrez, G., Margafin, J.C., Castañeda, R., Enriquez, O., Aubanel, M., y Sepúlveda, B.: Encuesta serológica nacional I. Investigación de anticuerpos contra E. histolytica en una localidad semirural de la costa del Golfo de México. Arch. Invest. Med. (Méx.) 5: s 475, 1974.
41. Gutiérrez, G., Ludlow, A., Espinosa, G., Herrera, S., Muñoz, O., Rattoni, N., y Sepúlveda, B.: Encuesta serológica nacional. II. Investigación de anticuerpos contra E. histolytica en la República Mexicana. En Proceedings of the International Conference on Amebiasis. (B. Sepúlveda y L.S. Diamond, ed.) Instituto Mexicano del Seguro Social, México 1976. p. 599.
42. Cuadrado, R. y Kagan, J.G.: The prevalence of antibodies to parasitic diseases in sera of young army recruits from the United States and Brazil. Amer. J. Epidem. 86: 330, 1967.
43. Juniper, K. Jr., Worrel, C.L., Minshew, S., Roth, L.S., Cyper, H. y Lloyd, R.E.: Seroepidemiology of amebiasis in Arkansas. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: s 445, 1971.
44. Krupp, I.M. y Powell, S.J.: Antibody response to invasive amebiasis in Durban, South Africa. Amer. J. Med. Hyg. 20: 414, 1971.
45. Gutiérrez-Trujillo, G.: Aspectos clínicos de la amibiasis invasora en niños. II. Absceso hepático. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: s 355, 1971.
46. Gutiérrez-Trujillo, G.: Características principales de la amibiasis invasora en el niño. Actualización de algunos conceptos clínicos y epidemiológicos. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11: s 281, 1980.
47. Sepúlveda, B.: La amibiasis invasora por Entamoeba histolytica. Gac. Med. Méx. 100: 201, 1970.

48. González-Montesinos, F., Lee-Ramos, F.A. y Aguirre-García, J.: Influencia del sexo y la edad en la amibiasis invasora del hígado. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: s 395, 1971.
49. Capín, M.R., Ortiz-Ortiz, L., Zamacona, G.R. y Aubanel, M.: Efecto del mercaptoetanol en las reacciones serológicas de la amibiasis invasora. Arch. Invest. Med. (Méx.) 4: s 177, 1973.
50. Arellano, M.T., y Ortiz-Ortiz, L.: Algunas propiedades de la globulina específica del suero de pacientes con absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Med. (Méx.) 3: s 487, 1974.
51. Guerrero-Alcázar, M., Ramírez-Espinoza, M.E., González, M.S. y Sepúlveda, B.: Acción a corto plazo del suero humano hiperinmune sobre el trofozoito de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 3: s 311, 1972.
52. Guerrero-Alcázar, M., Sepúlveda, B., González, M.S. y Ramírez-Espinoza, M.E.: Adición del complemento al suero humano hiperinmune inactivado: su efecto sobre el trofozoito de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 3: s 325, 1972.
53. Chávez, A., Iturbe-Alessio, J., Sepúlveda, B., Segura, M., y Ortiz-Ortiz, L.: Respuesta morfofisiológica de los trofozoitos de E. histolytica a la acción del suero humano inmune correspondiente. Arch. Invest. Med. (Méx.) 4: s 71, 1973.
54. Sepúlveda, B., Chávez, A., Iturbe-Alessio, J. y Ortiz-Ortiz, L.: Efecto de la gammaglobulina inmune anti-amibiana sobre el trofozoito de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 4: s 79, 1973.
55. Sepúlveda, B., Tanimoto-Weki, M., Calderón, P. y De la Torre, M.: Neutralización de la virulencia en cultivos de E. histolytica con suero. Arch. Invest. Med. (Méx.) 5: s 447, 1974.

56. De la Torre, M., Ortiz-Ortiz, L., de la Hoz, R. y Sepúlveda, B.: Acción del suero humano inmune y de la gammaglobulina antiambiiana sobre cultivos de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 4: s 67, 1973.
57. Chévez, A., Ortiz-Ortiz, L., De la Torre, M. y Sepúlveda B.: Inducción de inmunidad antiambiiana en primates subhumanos con antígeno lisosomal de Entamoeba histolytica. IV. Efecto citopatogénico del suero de monos sobre trofozoitos de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11: s 257, 1980.
58. Capín, N.R., Capín, R., Zamacona, G. y Ortiz-Ortiz, L.: Activación de la vía alterna del complemento por varias cepas axénicas de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 9: s 292, 1978.
59. Ortiz-Ortiz, L., Capín, R., Capín, N.R., Sepúlveda, B. y Zamacona, G.: Activation of the alternative pathway of complement by Entamoeba histolytica. Clin. Exp. Immunol. 34: 10, 1978.
60. Calderón, J. y Schreiber, R.D.: Activation of the alternative and classical complement by Entamoeba histolytica. Infect. Immun. 50: 560, 1985.
61. Huidt, G., Davies, P., Allison, A.C. y Schorlemmer, H.U.: Interactions between Entamoeba histolytica and complement. Nature 277: 214, 1979.
62. Capín, R., Capín, N.R., Carmona, M. y Ortiz-Ortiz, L.: Effect of complement depletion on the induction of amebic liver abscess in the hamster. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11: s 173, 1980.
63. Calderón, J., Muñoz, M. y Acosta, V.H.: Redistribución de antígenos superficiales de Entamoeba y su caracterización inmunológica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 9: s 183, 1978.
64. Calderón, J.: Dynamic changes on the surface of Entamoeba induced by antibodies. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11: s 55, 1980.



65. Calderón, J., Muñoz, M. y Acosta, M.H.: Surface redistribution and release of antibody induced caps in Entamoeba. J. Exp. Med. 151: 184, 1980.
66. Pinto, D.A., Silva, P., Martínez-Palomo, A. y González-Robles, A.: Membrane structure and surface coat of Entamoeba histolytica. J. Cell Biol. 64: 538, 1975.
67. Kettis-Aust y Sundqvist, K.G.: Dynamics of the interaction between Entamoeba histolytica and components of the immune response. Scand. J. Immunol. 12: 443, 1980.
68. León, A.: Pronóstico tardío en el absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Med. (Méx.) 1: s 205, 1970.
69. Diamond, L.S.: Techniques of axenic cultivation of E. histolytica Schaudinn 1903 and E. histolytica-like amoebae. J. Parasitol. 54: 1047, 1968.
70. Diamond, L.S.: Axenic cultivation of E. histolytica. Science 134: 336, 1961.
71. Sepúlveda, B., Tanimoto, M., Vázquez-Sasvedra, J.A., y Landa, L.: Inducción de inmunidad anti-amibiana en el hamster, con antígeno obtenido de cultivos axénicos de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: s 289, 1971.
72. Tanimoto-Weki, M., Vázquez-Sasvedra, J.A., Calderón Lara, F. y Aguirre-García, J.: Inmunidad consecutiva a la inyección de antígeno amibiano axénico en el hamster. Arch. Invest. Med. (Méx.) 4: s 147, 1973.
73. Sepúlveda, B., Tanimoto-Weki, M., Guerrero, A., y Solís, G.: Inmunidad en hamsters consecutiva a vacunación con cultivos monoxénicos y axénicos de E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4: s 159, 1973.

74. Vázquez-Saavedra, J.A., Tanimoto-Weki, M., Olivera-López, J.I., Caracheo Reyes, F. y Cortés-Arcos, A.: Inmunidad consecutiva e infección amibiana curada en el hamster. Arch. Invest. Med. (Méx.) 4: s 155, 1973.
75. Sepúlveda, B., Tanimoto-Weki, M., Calderón, F. y De la Ros, R.: Inducción de inmunidad pasiva anti-amibiana en el hamster por la inyección de suero inmune. Arch. Invest. Med. (Méx.) 5: s 451, 1974.
76. Krupp, I.M.: Inducción experimental de inmunidad protectora para la infección amibiana. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: s 415, 1974.
77. Ortíz-Ortiz, L.: Inducción de inmunidad protectora anti-amibiana con "nuevos antígenos" en el hamster lactante. E. Reacción inmunológica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 9: s 325, 1978.
78. Vinayak, V.K., Sehney, S., Jain, P., y Chakravarti, R.N.: Protective effects of crude and chromatographic fractions of axenic Entamoeba histolytica in guinea-pigs. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74: 483, 1980.
79. Sepúlveda, B.: Inducción de inmunidad anti-amibiana en primates sub-humanos con antígeno lisosomal de Entamoeba histolytica VIII. Comentarios y conclusiones. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11: s 275, 1980.
80. Arroyo-Bogovich, A.: Inducción de inmunidad protectora anti-amibiana con "nuevos antígenos" en el hamster lactante. b. Material antigénico. Arch. Invest. Med. (Méx.) 2: s 311, 1978.
81. Oliva, A., Correa, I. y Ortíz-Ortiz, L.: Inmunogenicidad de un nuevo antígeno de Entamoeba histolytica deslipidizado. Arch. Invest. Med. (en prensa).
82. Pérez-Tamayo, R. y Brandt, E.: Amebiasis. En: Pathology of protozoal and helminthic diseases. (Narcial-Bojas, ed.) Williams & Wilkins, Baltimore, 1971. p. 145.

83. Aguirre-García, J.: Peculiaridades histológicas de la lesión amebiana. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1: s 147, 1970.
84. Aguirre-García, J., Calderón, P. y Tanimoto-Weki, M.: Examen histopatológico de las lesiones hepáticas en hámsters inoculados con cultivo axénico de E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 2: s 341, 1972.
85. Aguirre-García, J., Calderón-Lara, P., Vázquez-Saavedra, J.A. y Tanimoto Weki, M.: Estudios histopatológicos de las lesiones hepáticas en hámsters inoculados con distintas cepas de E. histolytica desarrollada en condiciones axénicas. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4: s 109, 1973.
86. Tsutsuni, V., Mena-López, R., Anaya-Velázquez, F. y Martínez-Palomo, A.: Cellular basis of experimental amebic liver abscess formation. Am. J. Pathol. 81: 117, 1984.
87. Fastag-de Shor, A., Ramírez-Espinosa, M.E., Gil-Barbosa, M. y Villegas-González, J.: Actividad enzimática de E. histolytica en lesiones experimentales de conejo. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 2: s 287, 1972.
88. Treviño-García Manzo, N., De la Torre, M., Ruiz de Chávez, I., Hernández López, R. y Escobedo, A.: Morfología de E. histolytica en el absceso hepático del hámster. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1: s 61, 1970.
89. Guerrero, M., Larriva-Sahd, J., Ramírez, M.E., Rios, D. y Ruiz-Molina, A.: Collagen fibers in liver experimental amebic lesion. An ultrastructural study. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13: s 223, 1982.
90. Treviño-García Manzo, N., Castañeda, M. y Tanimoto-Weki, M.: Probable mecanismo de acción de E. histolytica en el hígado del hámster. Estudio submicroscópico. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 5: s 393, 1974.
91. Lowry, O.H., Rosen Brough, N.J., Farr, A.L., y Randall, E.J.: Protein measurement with the folin reagent. J. Biol. Chem. 193: 265, 1951.

92. Garvey, J.S., Cremer, N.E. y Sussdorf, D.H.: *Methods in immunology*. 3th. ed. W.A. Benjamin, Inc. U.S.A. 1977. p. 218.
93. Kohler, S. y Milstein, C.: Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495, 1975.
94. Ortiz-Ortiz, L., Jiménez, C., Mendoza, F., Michalak, C., Melendro, I., y Oliva, A.: Entamoeba histolytica: Specific antigen recognized by a monoclonal antibody. *Exp. Parasitol.* 61: 390, 1986.
95. Tanimoto, M., Sepúlveda, B., Vázquez-Saavedra, J.A. y Landa, L.: Lesiones producidas en el hígado del hamster por inoculación de Entamoeba histolytica cultivada en medio axénico. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 2: s 275, 1971.
96. Aguirre-García, J., Calderón, P. y Tanimoto-Weki, M.: Examen histopatológico de las lesiones hepáticas en hamsters inoculados con cultivo axénico de Entamoeba histolytica. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 3: s 341, 1972.
97. Trissl, D. y Martínez-Palomo, A.: Surface properties related to Concanavalin A-induced agglutination. *J. Exp. Med.* 145: 652, 1977.