

59
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE E. histolytica A LA INCUBACION CON ANTICUERPOS FIJADORES DE COMPLEMENTO DIRIGIDOS CONTRA LPFG DE AMIBA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :
LAURA GEORGINA SANCHEZ LEON



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
ANTECEDENTES.....	2
HIPOTESIS.....	10
OBJETIVOS.....	11
MATERIAL Y METODOS.....	12
RESULTADOS.....	20
DISCUSION.....	37
CONCLUSIONES.....	41
APENDICE	
a) ABREVIATURAS.....	42
b) REACTIVOS.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	45

RESUMEN

Se han podido cultivar en medio axénico trofozoítos de Entamoeba histolytica, lo que ha permitido estudiar diferentes aspectos sobre este parásito, entre los cuales se encuentra el estudio de antígenos (Ag). Por el método de fenol-agua, se han podido extraer de la superficie de los trofozoítos, moléculas de lipopeptidofosfoglicana que es inmunogénica para conejos y reacciona en con trainmunolectroforesis y hemólisis pasiva con suero de pacientes con absceso hepático amibiano.

Se obtuvo un suero hiperinmune de conejo anti-LPFQ, el cual al interaccionar con la superficie de la amiba, forma un complejo Ag-Ac (antígeno-anticuerpo) capaz de activar la vía clásica del complemento (C), disminuyendo la viabilidad del parásito conforme pasa el tiempo de incubación y hay una mayor cantidad de anticuerpos presentes en el suero hiperinmune, por lo que estos anti----cuerpos podrían tener una función protectora en el hospedero.

El efecto refractario de la amiba al C y Acs no se observó, ya que se obtuvo igual porcentaje de viabilidad en la primera y segunda incubación de los trofozoítos con suero hiperinmune y C, sin embargo, se sugiere realizar más estudios para corroborar estos experimentos.

INTRODUCCION

La Amibiasis se ha definido como la parasitosis que afecta al ser humano - debido a la ingestión de quistes de Entamoeba histolytica (Schaudin, 1903) con o - sin manifestaciones clínicas (1). Ocurre en todo el mundo y no es una parasitosis tropical, ya que se encuentra en todos los climas incluyendo regiones subpolares, afecta primordialmente a grupos de poblaciones de bajo nivel económico debido a la mala nutrición, hacinamiento y malas condiciones de higiene (2).

El ciclo biológico de Entamoeba histolytica está bien definido. El quiste infectante de Entamoeba histolytica puede sobrevivir fuera del hospedero por -- semanas o meses en condiciones de humedad (3), y cuando se ingiere, el parásito resiste el jugo gástrico normal del estómago, llegando a la parte baja del in-- testino delgado. Una vez ahí por acción de jugos digestivos neutros o alcalinos y la actividad de la amiba se rompe la pared de los quistes, liberando una ami-- ba metaquistica de cuatro núcleos que finalmente se divide en ocho trofozoítos pequeños (1), que pasan al intestino grueso. Algunos trofozoítos atacan las cé-- lulas del epitelio intestinal causando disentería o ulceración del colon, en -- ocasiones puede llegar a invadir otros tejidos.

La Amibiasis intestinal puede ser benigna (se caracteriza por disentería) siendo más frecuente en niños, teniendo una incidencia de un 2 a 4% en México - (4). La forma severa, es la colitis amibiana fulminante, con una mortalidad --- entre 20 y 54%. El absceso hepático amibiano es el problema más frecuente en Mé-- xico (5). Estudios epidemiológicos indican que el 10% de la población mundial - está infectada por Entamoeba histolytica (1).

ANTECEDENTES

a) Biología.

Entamoeba histolytica pertenece a la familia Entamoebidae, al orden -

Amoebidae, phylum Sarcomostigophora, subphylum Sarcodina (6). El tamaño de los trofozoítos de Entamoeba histolytica oscila entre un diámetro de 10 a 60 micrometros (μm), con un diámetro promedio de 35 μm (7), contienen un núcleo excéntrico, con una cromatina fina periférica y un nucleolo central. El citoplasma consiste en un ectoplasma refringentes y un endoplasma granular que contiene numerosas vacuolas. Los pseudópodos ectoplásmicos, delgados, digitiformes se forman rápidamente (7,8,9). Existen ribonucleoproteínas en el aparato helicoidal en el citoplasma (10,11). Es un anaerobio facultativo con vesículas ecto-endoplásmicas ligadas a la doble capa de la membrana (9,12,13). La amiba contiene un área del uroide, que aparece como una cola con pliegues irregulares, externa a la membrana celular donde se notan vesículas (9,14). Contienen un glicocálix que mide 20-30 nanómetros (nm), cuando se encuentra asociado a bacterias, aisladas de tejidos, mientras que el glicocálix de las amibas cultivadas mide 5nm(15). Se han identificado estructuras con aspecto de microfilamentos y actina en los trofozoítos de Entamoeba histolytica (10,16,17). No se ha evidenciado la presencia de mitocondrias o microtúbulos citoplásmicos. Estos organismos no contienen retículo endoplásmico rugoso, pero sí un pequeño retículo endoplásmico liso. La amiba contiene glucógeno y vacuolas digestivas (18). Las amibas requieren de un pH bajos (6.0-6.5) y un medio complejo para crecer (19,20).

b) Membrana plasmática.

Se han extraído antígenos de membrana plasmática de los trofozoítos de Entamoeba histolytica como moléculas de proteínas, las cuales se han purificado e identificado, encontrándose anticuerpos contra estas moléculas en sueros de pacientes con absceso hepático amibiano(21). Doce péptidos han sido separados por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio, que se identificaron como glicoproteínas. Se encontró que, a su vez, existe un alto contenido de colesterol siendo ésta una característica de las membranas plasmá-

ticas de otras variedades de amibas, como A. castellanii y E. invadens (22). Se ha extraído también de la membrana de los trofozoitos de Entamoeba histolytica una lipopeptidofosfoglicana (LPFG), por el método fenol-agua (Westphal-Jann) -- (23) encontrándose que está compuesta por manosa, glucosa, galactosa, azúcares aminados y fucosa. Al compararse los azúcares encontrados por esta extracción con los de una extracción hecha por el método de Freeman-Staub, se verificó que eran los mismos. También se determinó que esta lipopeptidofosfoglicana es inmunógena para conejos y reaccionó por contrainmunolectroforesis y hemólisis pasiva con el suero de pacientes diagnosticados de absceso hepático amibano (24, 25).

La superficie de la membrana de las amibas tiene diferentes características, como la aglutinación inducida por Concanavalina A, que parece ser un marcador de patogenicidad entre diferentes cepas debido a que cepas patógenas de Entamoeba histolytica aglutinan más fácil a concentraciones bajas de Concanavalina A, que las cepas aisladas de individuos asintomáticos. Se sugiere que esta capacidad de las cepas patógenas de Entamoeba histolytica para aglutinar con Concanavalina A está ligada a una lectina y a su carga negativa en la superficie celular (26). Otra característica in-vitro es de que anticuerpos poliespecíficos ligados a Entamoeba histolytica inducen una redistribución de superficie de los componentes de membrana a través de la región del uroide, en donde los Acs son ingeridos y después liberados, a esto se le denomina casquete y posteriormente hay una regeneración de la membrana plasmática. Estas características podrían contribuir a la supervivencia del parásito en el hospedero durante la infección. La capacidad de formar casquetes no parece correlacionar con la virulencia del parásito in-vivo (27). Por otra parte se encontró que cuatro cepas de E. histolytica poseen actividad de lectina, por lo que no correlaciona esta actividad de lectina y la relativa virulencia de las cepas (28).

c) Inmunología Humoral.

Diferentes cepas de Entamoeba histolytica tienen un gran número de antígenos, particularmente aquellos que inducen una respuesta humoral (7). La --- cual se identifica por la presencia de anticuerpos circulantes específicos, - que son generalmente detectables en pacientes después de una semana de la apari- ción de los síntomas. Es frecuente que exista una reinfección a pesar de la pre- sencia de anticuerpos (29). Estos anticuerpos permanecen de dos a once años des- pués de la infección (30). Existen anticuerpos antiamiba de la clase IgM (31), - aunque la IgG es la que se encuentra en mayor cantidad y de esta la subclase -- IgG₂ es la que predomina (32). Se ha podido detectar la producción de IgA con-- tra lipopeptidofosfoglicana de amiba en bilis de ratas inoculadas intracecal-- mente con trofozoítos de Entamoeba histolytica (33). En calostro podemos encon- trar anticuerpos de clase IgA anti-LPFG (34). Algunos estudios muestran la pre- sencia de coproanticuerpos de clase IgA, en amibiasis intestinal y estos persis- ten por un corto tiempo (35). La secreción IgA es importante debido a que puede inhibir el establecimiento de E. histolytica en la luz intestinal. También hay anticuerpos antiamiba de clase IgE (36). En amibiasis hepática se detectan anti- cuerpos contra Entamoeba histolytica en exudados del absceso (37,38).

c) Complemento.

El Complemento es un sistema biológico complejo, compuesto por glico-- protefnas (Cuadro 1) (39), que circulan en el fluido extracelular con ciertas - actividades biológicas (Cuadro 2) (40). La activación del complemento puede ser por vía clásica, que es llevada a cabo por complejos inmunes IgG o IgM. Esta -- activación involucra la unión de una macromolécula C₁ a la región Fc del anti- cuerpo ligado al antígeno hasta C₉. Se ha estudiado este complejo por microscopía electrónica, observándose que tiene una forma cilíndrica. Debido a la inser- ción de este cilindro en la membrana celular, hay pérdida de pequeñas moléculas

intracelulares, potasio, hacia el medio externo y un subsecuente influjo extracelular de agua, debido a la presión osmótica intracelular, por lo que la célula aumenta de tamaño habiendo una ruptura de la membrana.

También puede activarse la vía alterna, y esta es por complejos inmunes de IgE o IgA, por endotoxinas, por inulina, lipopolisacáridos y por agar (41). Esta vía se inicia a partir de la activación de C_3 hasta C_9 . Ambas vías pueden ser organizadas dentro de varios pasos: iniciación, amplificación y ataque a la membrana (Fig. 1) (39).

El complemento es otro factor humoral envuelto en la defensa contra Entamoeba histolytica. El suero de pacientes infectados con altos títulos de anticuerpos contra Entamoeba histolytica y sueros normales son buenos amebicidas, a través de la activación de la vía clásica o alterna de Complemento (42, 43, 44). Aunque también se ha demostrado que la superficie de la ameba puede activar la vía clásica del complemento, sin la participación de anticuerpos específicos; esta activación es mayor a la inducida por la vía alterna (44). En algunos pacientes con absceso hepático amebiano, disminuye la concentración de C_3 , encontrándose normales los niveles de C_1 , lo que sugiere la activación de la vía alterna del Complemento (45). Se ha visto que diferentes cepas de Entamoeba histolytica pueden activar la vía alterna de complemento (46). El suero normal humano inhibe el crecimiento de los trofozoitos en cultivo (47). Otros estudios demuestran que cepas patógenas, algunas aisladas de absceso hepático amebiano, son resistentes a la lisis mediada por complemento. Estos estudios sugieren que la resistencia a la lisis mediada por complemento de las cepas patógenas pueden ser un factor importante para la diseminación e invasión in-vivo (38). Otros estudios muestran que las cepas patógenas y las no patógenas son capaces de activar la vía clásica de complemento aunque esta no es necesaria para la lisis de las amebas. Estos resultados sugieren que las cepas patógenas de Entamoeba histolytica activan complemento pero son capaces de evadir la lisis mediada por complemento (48).

Cuadro 1: Proteínas del Sistema Complemento (39)

Proteínas	Peso Molecular	Conc. en plasma ug/ml
Vía Clásica		
C1 _q	400,000	65
C1 _r	190,000	50
C1 _s	88,000	40
C4	200,000	640
C2	117,000	25
C3	185,000	1400
Vía Alterna		
Factor B	93,000	200
Factor D	23,000	2
C3	185,000	1400
Ataque a la membrana		
C5	200,000	80
C6	128,000	75
C7	121,000	55
C8	154,000	55
C9	79,000	60
Proteínas reguladoras		
C1 inh.	85,000	20
C4 b	570,000	250
N-Carboxipeptidasa		
Factor H	150,000	500
Factor I	80,000	35
Properdina	180,000 (het.)	25
Proteína S	71,000	600

Cuadro 2: Actividades Biológicas del Complemento (40)

	Componente (s)
Sobre los complejos inmunes	
Agregación	C1q
Solubilización	C3b
Sobre los vasos y fibras musculares lisas	
Aumento de la permeabilidad vascular y contracción de las fibras musculares lisas	C2 quinina, -- C3a, C5a
Sobre las células	
Quimiotactismo de los polimorfonucleares y macrófagos	C3a, C5a, C5b67
Aumento de la movilidad de los polimorfonucleares	Ba
Inhibición de la migración de los macrófagos y repartición	Bb
Movilización de los leucocitos medulares	C3a
Agregación y marginación de los polimorfonucleares circulantes y neutropenia ("in vivo")	C5a
Agregación de los polimorfonucleares "in vitro"	C5a
Liberación de las enzimas lisosomales por los polimorfonucleares	C5a
Secreción de proteasa por los macrófagos	C3b
Inmunoaderencia	C3a, C5a, C5b67
Opsonificación	C3b
Estimulación de los linfocitos B	C3b
Liberación de histamina por las plaquetas	C3, C1-6, C1-9
Citólisis	C8, C9
Modulación de la respuesta inmune	C3b, C4b, C3a
Sobre la formación de inmunoconglutinina	C3b
Sobre la coagulación	
Mecanismo que depende de las plaquetas (sólo en el conejo)	C6
Sobre los virus	
Neutralización del virus herpes	C1+C4
Lisis de las células infectadas por virus oncógenos	C1q, C9

HIPOTESIS

Considerando que en la superficie de los trofozoítos de Entamoeba histolytica existen moléculas de lipopeptidofosfoglicana, y siendo estas antigénicas, es probable que anticuerpos (de clase IgG e IgM) obtenidos de conejos inmunizados con lipopeptidofosfoglicana de amiba, interaccionen con los trofozoítos de Entamoeba histolytica, y al adicionar al sistema complemento, se active la vía clásica para eliminar a los trofozoítos.

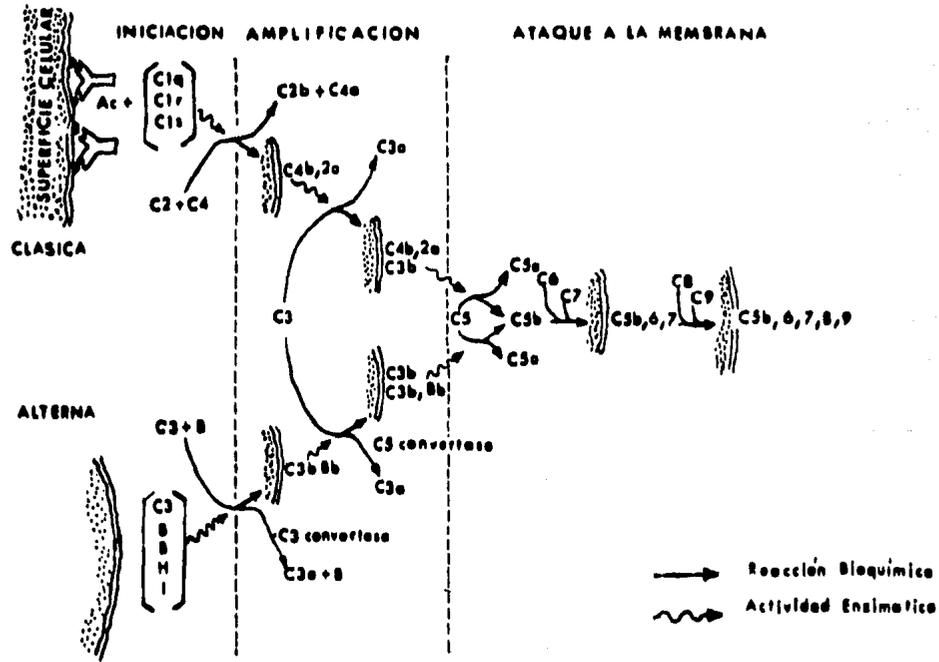


FIG. 1: REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ACTIVACION DE LAS DOS VIAS DEL COMPLEMENTO (39)

HIPOTESIS

Considerando que en la superficie de los trofozoítos de Entamoeba histolytica existen moléculas de lipopeptidofosfoglicana, y siendo estas antigénicas, es probable que anticuerpos (de clase IgG e IgM) obtenidos de conejos inmunizados con lipopeptidofosfoglicana de amiba, interaccionen con los trofozoítos de Entamoeba histolytica, y al adicionar al sistema complemento, se active la vía clásica para eliminar a los trofozoítos.

OBJETIVOS

1. Obtención de un suero hiperinmune anti-LPFG.
2. Determinación del título de anticuerpos contra lipopeptidofosfoglicana de Entamoeba histolytica.
3. Determinación de viabilidad de trofozoítos de Entamoeba histolytica después de la incubación con suero hiperinmune anti-LPFG y suero de cobayo.
4. Determinación de viabilidad de trofozoítos de Entamoeba histolytica a la reincubación con suero hiperinmune anti-LPFG y suero de cobayo.

MATERIAL Y METODOS

1. OBTENCION DE LIPOPEPTIDOFOSFOGLICANA (LPFC) DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica.

La lipopeptidofosfoglicana, se obtuvo por el método de fenol-agua (23), y fue donada por M.C. MarySanta Cruz Peralta y el Dr. Armando Isibasi, de la Unidad de Investigación Biomédica, Laboratorio de Inmunquímica del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social.

2. OBTENCION DE SUERO HIPERINMUNE CONTRA UNA LOPOPEPTIDOFOSFOGLICANA DE Entamoeba histolytica.

Se siguió el siguiente protocolo de inmunización:

Primero se sangró al conejo 5 ml., para tener un testigo del título inicial de anticuerpos (Ac) contra la molécula inmunogénica, se inmunizó con 1 mililitro (ml) de antígeno (Ag) (LPFG amiba 1 miligramo (mg/ml) con adyuvante completo de Freund volumen a volumen (v/v), subcutáneamente en varias partes de la región ventral. A los 15 días se volvió a inmunizar con 1 ml. de Ag (LPFG amiba 1 mg/ml) con adyuvante incompleto v/v en el mismo lugar. Después de 15 días se inmunizó con 1 ml. de Ag (LPFG amiba 1 mg/ml) con adyuvante incompleto v/v, en la región dorsal subcutáneamente. Siete días después se sangró 10 ml. y se le determinó el título de Acs por hemaglutinación pasiva. A los 15 días se le dió un refuerzo con 500 microlitros (μ l) de Ag (LPFG 200 microgramos (μ g)/ml) con solución salina fisiológica (SSF), intravenosamente. A los siete días se sangró 20 ml. y se determinó el título de anticuerpos por hemaglutinación pasiva. Quince días después se le dió otro refuerzo con 500 μ l. de Ag (LPFG amiba 200 μ g/ml) con SSF, intravenosamente. A los 7 días se sangró 20 ml. y se probó el título de anticuerpos por hemaglutinación pasiva.

La sangre que se obtuvo fue incubada 15 minutos (min) a 37°C y se centrifugaron a 2000 revoluciones por minuto (rpm) en un diámetro de rotor de 10.5 centímetros (cm) por 10 min para eliminar el coágulo. Los sueros fueron conservados en alícuotas de 0.5 ml a -20°C.

3. OBTENCION DE SUERO NORMAL DE CONEJO (SNC).

Se obtuvieron 20 ml de sangre por punción cardíaca, se dejaron incubando a 37°C por 15 min, fue separado el coágulo por centrifugación a 2000 rpm en un diámetro de rotor de 10.5 cm por 10 min. Se alícuotó el suero y se conservó a -20°C hasta su uso.

4. HEMAGLUTINACION PASIVA.

a) Sensibilización de los eritrocitos con LPFG de amiba.

Se tomaron aproximadamente 4 ml de glóbulos rojos de carnero (GRC), conservados en solución Alsever estéril a 4°C, los cuales fueron lavados 3 veces con amortiguador salino de fosfatos pH 7.4 (PBS) centrifugado a 2500 rpm con un diámetro de rotor de 10.5 cm durante 10 min. Se tomó 0.3 ml del paquete de GRC y se les añadió 20 ml de PBS al que previamente se le adicionó 2 mg de papaína (Sigma Chemical Co.) y 1 mg de cisteína (Merck), se dejó en incubación en baño maría a 37°C por 30 min con agitación continua y posteriormente los GRC fueron lavados 3 veces con PBS. El botón de GRC se resuspendió en 10 ml de PBS y se subdividió en dos fracciones de 5 ml cada uno y se adicionó a uno de los tubos 350 µl de LPFG (2 mg/ml en PBS) y se incubaron durante 1 hora (hr) a 37°C con agitación continua. Se lavaron 3 veces con PBS ambos tubos y el paquete de eritrocitos de cada tubo se resuspendió en 30 ml de PBS.

b) Tratamiento de las muestras.

Tanto el suero hiperinmune como el suero normal de conejo (SNC) fueron descomplementados a 56°C en baño maría durante 30 min. Posteriormente los sueros fueron adsorbidos con GRC, en la siguiente proporción: 100 µl de suero - -

+ 10 µl del paquete de GRC previamente lavados con PBS. Se dejaron en incubación 2 hrs a 37°C con agitación continua. Después de pasado ese tiempo se centrifugaron a 1500 rpm con un diámetro de rotor de 10.5 cm por 5 min sacando el sobrenadante, el cual se utilizó en la técnica de hemaglutinación.

c) Técnica de hemaglutinación en microplaca.

La hemaglutinación se efectuó adicionando 100 µl de PBS en cada pozo de la microplaca fondo en "U" (Cooke Microtiter USA), agregando posteriormente en el primer pozo de la hilera 100 µl del suero problema en una dilución 1:5. Se hicieron diluciones dobles. Por cada suero se hicieron dos hileras de diluciones. Después se añadieron 100 µl de GRC sensibilizados con LPFG de amiba en la primera hilera y en la segunda 100 µl de GRC sin sensibilizar. Se incubó a temperatura ambiente 1 hr y se procedió a la lectura dando como título hemaglutinante, el título inmediato anterior en donde se observó un botón, esto es, eritrocitos sedimentados, que a diferencia de los eritrocitos que aglutinaron, no formaron la clásica malla aglutinante.

5. OBTENCION DE SUERO DE COBAYO.

Este suero fue utilizado como fuente de complemento (C) y para esto se obtuvo sangre venosa por punción cardiaca de dos cobayos, los cuales se anestesiaron previamente con 2 mg/kg de Ketalar (Parck Davis). La sangre obtenida se mantuvo en un baño de hielo hasta que se contrajo el coágulo y se separó el suero por centrifugación a 2000 rpm en un diámetro de rotor de 10.5 cm por 10 min a 4°C. El suero se guardó en alícuotas de 0.5 ml en tubos de 13 x 75, los cuales se liofilizaron en una liofilizadora (LABCONCO, Freeze DRY-3) y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

6. OBTENCION DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica.

Se utilizaron trofozoitos de Entamoeba histolytica de la cepa HM1, los --

cuales fueron obtenidos por crecimiento en cultivo axénico TYI-S-33 (19) a 37°C. Se cosecharon los trofozoítos de Entamoeba histolytica a las 72-96 hrs, las cuales corresponden a la fase logarítmica de crecimiento. Se lavaron 2 veces con PBS a 2000 rpm con un diámetro de rotor de 10.5 cm por 5 min. El botón de la última lavada se resuspendió en medio TYI-S-33 nuevo y se cuantificó en un hematocitómetro. Los trofozoítos se ajustaron a 5×10^4 trofozoítos de Entamoeba histolytica en 1 ml de medio de cultivo TYI-S-33.

7. DETERMINACION DE VIABILIDAD DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica POR EL METODO DE EXCLUSION CON AZUL DE TRIPAN.

Para hacer la determinación de viabilidad, se tomó 0.1 ml de la suspensión de trofozoítos de Entamoeba histolytica en un tubo y se añadió 0.1 ml. de solución de azul de tripán al 0.3%. Se homogenizó la suspensión y se colocó en un portaobjetos, se observó al microscopio-óptico.

Para determinar la viabilidad de contaron 300 trofozoítos de Entamoeba histolytica, tanto trofozoítos teñidos de azul (trofozoítos muertos) como trofozoítos refringentes (trofozoítos vivos) y se sacó el porcentaje de viabilidad tomando 300 trofozoítos como cien por ciento.

Este criterio se utilizó en todos los experimentos.

8. SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica A LA INCUBACION EN DIFERENTES INTERVALOS CON SUERO HIPERINMUNE (Anti-LPG).

Los trofozoítos de Entamoeba histolytica cepa HM1, se obtuvieron como se mencionó antes.

El suero de cobayo (fuente de C), liofilizado, se constituyó en 0.5 ml con Solución Amortiguadora de Barbital (SAB) y se hizo una dilución de 1:30 en SAB.

El suero hiperinmune contra LPG de amiba y SNC, se descomplementaron en baño maría a 56°C por 30 min.

En tubos de 13 x 75 se puso lo siguiente:

Tubo	Trofozoítos de <u>E. histolytica</u> 5 x 10 ⁴ 100 µl.	Fuente de Complemento 200 µl	Suero hiperinmune 200 µl	SNC 200 µl	EDTA 10mM 10 µl
1	+	+	-	+	-
2	+	+	+	-	-
3	+	+	+	-	+

Se incubaron los tubos a 37°C y se fueron haciendo determinaciones de viabilidad por el método de exclusión con azul de tripan a diferentes tiempos (5, 15, 30, 45, 60 min), durante cinco ocasiones, como se ha descrito.

9. SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica A LA INCUBACION CON DILUCIONES DEL SUERO HIPERINMUNE (Anti-LPFG).

A los trofozoítos de Entamoeba histolytica, al suero de cobayo, al suero hiperinmune anti-LPFG, SNC, se les hizo el tratamiento ya mencionado.

Una alícuota del suero hiperinmune descomplementado, se adsorbió con 0.2 ml de LPFG (2mg/ml) y se incubó por dos hrs a 37°C con agitación continua. Después se centrifugó a 1500 rpm en un diámetro de rotor de 10.5 cm por 10 min, se separó el sobrenadante, el cual fue usado como suero hiperinmune adsorbido (S. hiper.ads.).

En tubos de vidrio se puso lo siguiente:

Tubo	Trofozoítos de <u>E.h.</u> *5x10 100 µl	Fuente de C 200 µl	S.Hiper. ads. 200 µl	SNC 200 µl.	Diluciones S. hiperinmune 200 µl	EDTA 10 µl
1	+	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	+	+
3	+	+	-	-	-	-
4	+	+	-	+	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	+	+	-	-	+ 1:128	-
7	+	+	-	-	+ 1:64	-
8	+	+	-	-	+ 1:32	-
9	+	+	-	-	+ 1:16	-

10	+	+	-	-	+ 1:8	-
11	+	+	-	-	+ 1:4	-
12	+	+	-	-	+ 1:2	-
13	+	+	-	-	+ Concentrado	-

* E. h. = Entamoeba histolytica

Se incubaron los tubos 30 min a 37°C y se determinó la viabilidad por el método de exclusión con azul de tripan.

El experimento se realizó en 10 ocasiones.

10. SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS RESEMBRADOS DESPUES DE UNA INCUBACION CON SUERO HIPERINMUNE (anti-LPFG).

Para probar si la exposición previa a C, hace refractaria a las amibas a una segunda reincubación, se hizo lo siguiente:

A los trofozoitos de Entamoeba histolytica, al suero hiperinmune, al SNC, al suero de cobayo y al suero hiperinmune adsorbido, se les dió el tratamiento como ya se mencionó:

En tubos de 13 x 75 se puso lo siguiente:

Tubo	Trofozoitos de <u>E. h.</u> * 5 x 10 ⁶	Fuente de C. 200 µl	S.Hiper. ads. 200 µl	SNC 200 µl	S. Hiper-inmune 200 µl	EDTA 10mM 10µl
1	+	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	+ 1:2	+
3	+	+	-	-	-	-
4	+	+	-	+	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	+	+	-	-	+ 1:2	-

* E. h. = Entamoeba histolytica.

Se incubaron los tubos a 37°C por 30 min, posteriormente se tomó una alícuota de cada tubo para determinar la viabilidad por el método de exclusión de azul de tripan.

El tubo número 6 se centrifugó a 1500 rpm con un diámetro de rotor de 10.5 cm por 5 min, lavándose el botón con PBS. El botón se resuspendió con un

poco de medio TYI-S-33 y se pasó a un tubo de vidrio para su resiembra. Se dejó en crecimiento por 72 hrs a 37°C y después de ese tiempo se volvió a probar la susceptibilidad de los trofozoítos de Entamoeba histolytica al suero hiperinmune (anti-LPFG), como se mencionó antes.

11. MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Después de la interacción de los trofozoítos de Entamoeba histolytica con suero hiperinmune (anti-LPFG) o, suero hiperinmune adsorbido (30 min a 37°C), -- se centrifugaron los tubos 10 min a 2000 rpm con un diámetro de rotor de 10.5 -- cm, se eliminó el sobrenadante y los paquetes se fijaron con fijador Universal por 2 1/2 hrs. Se lavó con agua bidestilada y se post-fijó con tetróxido de osmio al 1% en agua bidestilada v/v por 2 1/2 hrs. Posteriormente se deshidrató la muestra usando alcoholes en concentraciones ascendentes de 50 a 100% y se incluyó en resina Epon. Se esperó hasta su polimerización (24-48 hrs). Se hicieron -- primero cortes semifinos de 0.5 micras con ultramicrotomo (Richter Ultracut, -- Australia), tiñéndose posteriormente con azul de toluidina al 1%, observándose al microscopio de luz. Posteriormente se hicieron cortes finos de 600 Å con -- ultramicrotomo y se tiñieron con acetato de uranilo y citrato de plomo, obser-- vándose al microscopio electrónico de transmisión (Jeol-100-S, Japón).

12. ANALISIS ESTADISTICO.

Se utilizó el Análisis de Varianza, para probar la diferencia de viabili-- dad de los trofozoítos de Entamoeba histolytica a la incubación con un suero hi perinmune (anti-LPFG) y diferentes testigos, debido a que este es un método --- apropiado para probar la igualdad de diversos tratamientos, siendo este uno de los métodos más utilizados en el campo de inferencia estadística. El objetivo -- de éste, es probar una hipótesis apropiada acerca de los efectos de los diferen tes tratamientos, en donde sólo un factor es investigado, en nuestro caso es el porcentaje de viabilidad. Además se requiere de que el experimento sea realiza--

do en un azar ordenado en donde los tratamientos son usados lo más uniformemente posible, por lo que se requiere hacer una transformación, para cambiar la escala de las medidas y tener una varianza constante, para hacer el análisis más válido.

Si se rechazara la hipótesis nula, nos indicaría que hay diferencias entre los tratamientos pero no se especifica exactamente en cual de los tratamientos hay diferencia, por lo que se realizaría un método para comparaciones múltiples siendo el apropiado el de "Tukey" ya que se basa en el estudio de un rango estadístico. (49,50)

RESULTADOS

1. TITULACION DEL SUERO HIPERINMUNE

El título del suero hiperinmune (anti-LPFG) se determinó por la técnica -- de hemaglutinación pasiva, obteniéndose un título final de 1:1280 y sin anti-- cuerpos hemoaglutinantes en el suero normal de conejo. (fig. 2)

1/5 1/10 1/20 1/40 1/80 1/160 1/320 1/640 1/1280

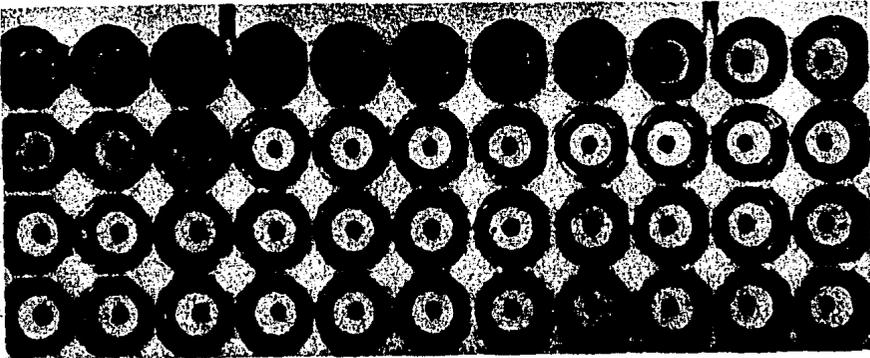


Fig. 1: Hemaglutinación pasiva

a) Suero hiperinmune (anti-LPFG).

b) Suero normal de conejo.

1) Eritrocitos sensibilizados con LPFG.

2) Eritrocitos sin sensibilizar.

2. SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica A LA INCUBACION EN DIFERENTES INTERVALOS CON SUERO HIPERINMUNE (anti-LPFG).

En el Cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos de la viabilidad de los trofozoitos de Entamoeba histolytica en diferentes intervalos de tiempo, en donde en la gráfica 1 se observa una gran diferencia de viabilidad cuando se usa suero hiperinmune (anti-LPFG) a cuando se usa suero normal de conejo y suero hiperinmune con EDTA.

3. SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica A LA INCUBACION CON DILUCIONES DEL SUERO HIPERINMUNE (anti-LPFG).

En el Cuadro 4 podemos observar que a mayor cantidad de anticuerpos presentes en el suero hiperinmune hay una menor viabilidad de los trofozoitos de Entamoeba histolytica, después de la incubación a 37°C por 30 min. En la gráfica 2 podemos visualizar mejor este efecto.

4. SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS RESEMBRADOS DESPUES DE UNA INCUBACION CON SUERO HIPERINMUNE (anti-LPFG).

Este experimento se realizó para probar si la exposición previa a C, se hace refractaria a una segunda reincubación. Por los resultados obtenidos (Cuadro 5, gráfica 3).

Se ve que existe el mismo porcentaje de viabilidad en cuanto a la primera y segunda incubación con el suero hiperinmune.

5. ANALISIS ESTADISTICO.

En el Cuadro 6 se muestra el tratamiento que se le hicieron a los datos --

para hacer más homogénea la muestra y poder hacer el análisis de Varianza y com probar si existe igualdad de los diferentes tratamientos.

6. MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Podemos observar en la figura 3 que los trofozoítos de Entamoeba histolyti ca después de la interacción con suero hiperinmune, muestran una secuencia en - la membrana plasmática.

En la figura 4 vemos que hay un rompimiento de la membrana plasmática de - los trofozoítos después de la interacción con suero hiperinmune anti-LPFG.

**SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE *E. histolytica* A LA INCUBACION
CON ANTICUERPOS FIJADORES DE COMPLEMENTO DIRIGIDOS CONTRA LPFG DE AMIBA.**

**Cuadro 3: SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE *E. histolytica* A LA INCUBACION EN
DIFERENTES INTERVALOS CON SUERO HIPERINMUNE (anti-LPFG).**

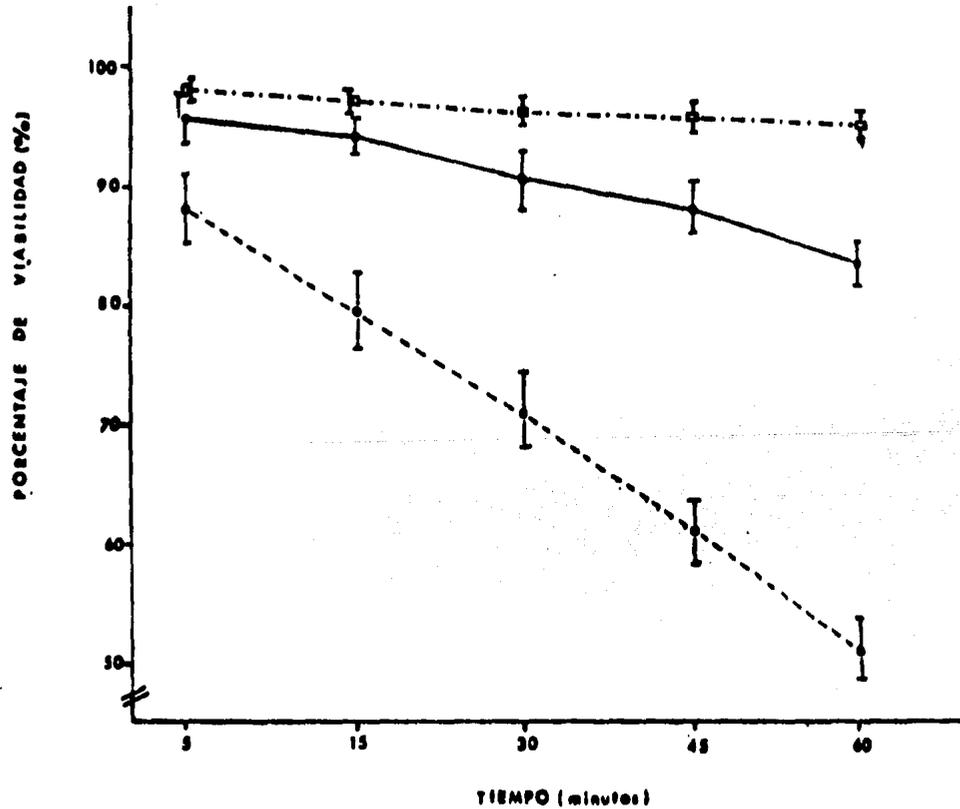
	Tiempo minutos	5'		15		30		45		60	
		X	V	X	V	X	V	X	V	X	V
SUERO NORMAL CONEJO		94.66	94.33	89	86.66	82.66					
		96.66	85	90	88.33	83.33					
		95.66	83.33	90.66	87.66	84					
		97.33	95.33	92.66	89.33	84.66					
		95	93.33	90.33	88.66	83.66					
		Σ	479.31	471.32	452.65	440.64	418.31				
	Promedio	95.86	94.26	90.53	88.12	83.66					
	d.s.	± 2.00	± 1.65	± 2.40	± 1.62	± 1.33					
SUERO HIPERINMUNE (anti-LPFG)		85.66	78	70.66	62.33	50.33					
		89	79.33	69.33	60.33	51					
		91	82.66	72	60	53.66					
		87.33	78.33	69	61	52					
		88.33	80.33	73.66	63.33	30					
		Σ	441.32	398.65	354.98	306.99	256.99				
	Promedio	88.26	79.73	70.99	61.39	51.39					
	d.s.	± 3.54	± 3.35	± 3.34	± 2.50	± 2.64					
SUERO HIPERINMUNE (anti-LPFG) + EDTA		98	97.33	96.66	96	95.33					
		97.33	97	96	95.66	94.66					
		98.66	97.66	97	96.33	95					
		98.33	96.33	96	95.66	95.33					
		98.66	97	96.33	95.33	94.66					
		Σ	490.98	485.32	481.99	478.98	474.98				
	Promedio	98.19	97.06	96.39	95.79	94.99					
	d.s.	± 0.99	± 0.88	± 0.77	± 0.68	± 0.59					

Todos los experimentos se realizaron como se describe en Material y Métodos en 5 diferentes ocasiones -
y se probaron por duplicado, en el Cuadro se expresan sus valores promedio.

XV = Porcentaje de viabilidad

d.s. = desviación estandar.

Σ = sumatoria



GRAPICA 1: SUSCEPTIBILIDAD DE TROPOZOITOS DE *E. histolytica* A LA INCUBACION EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO CON SUERO HIPERINMUNE (ANTI-LPPG)

Se representa el promedio de 5 experimentos realizados por duplicado

—○— SNC

—○— Suero hiperinmune anti-LPPG

—□— Suero hiperinmune anti-LPPG + EDTA

**SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE E. histolytica A LA INCUBACION
CON ANTICUERPOS FIJADORES DE COMPLEMENTO DIRIGIDOS CONTRA LPFG DE AMIBA.**

**Cuadro 4: SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica A LA INCUBACION
CON DILUCIONES DEL SUERO HIPERINMUNE (anti-LPFG)**

Trofozoitos E. H.	Trofozoitos E. H. S. hiperinm. C	Trofozoitos E. H.	Trofozoitos E. H. S. hiperinm. C	Trofozoitos E. H. S. hiperinm. ads.	Trofozoitos E. H. S. hiperinm. 1:120 dil C	Trofozoitos E. H. S. hiperinm. 1:64 dil C	Trofozoitos E. H. S. hiperinm. 1:20 dil C	Trofozoitos E. H. S. hiperinm. 1:10 dil C	Trofozoitos E. H. S. hiperinm. 1:8 dil C	Trofozoitos E. H. S. hiperinm. 1:4 dil C	Trofozoitos E. H. S. hiperinm. 1:2 dil C	Trofozoitos E. H. S. hiperinm. 1:1 dil C	Trofozoitos E. H. S. hiperinm. concentrado C
8 V	8 V	8 V	8 V	8 V	8 V	8 V	8 V	8 V	8 V	8 V	8 V	8 V	8 V
00.00	00	00.00	00	00.00	00	00	79.70	76.00	73	71	00	00	03.20
07.00	00	00.00	00	00	00	01.33	77.33	77.33	74.33	71.30	00	00	07.00
06.00	00.20	00.00	00.20	00.20	00	00	03.20	79.00	79	75	00.00	00	03.00
00	00.00	00	00.20	00.20	00.00	00.20	04.00	00	70.33	70.00	00.00	00	00
07	00.00	00.00	00.33	00.00	00	00.00	00	77.33	72.00	70.00	71	00	00
00.00	00	00.00	00.30	00.00	07.00	00	01	77	72.33	70	00.00	00	03.00
00.00	00.20	00.00	00.30	00	03.00	04.30	00	70.00	72	69.00	00.30	00.30	04.20
00.20	00.00	00	00.20	00	09.00	00	01.00	70.00	70.00	71	00.00	00.00	04.00
07	00	00.20	00	00.00	00	00	02.00	70.20	74.00	71.00	70	00	04.00
00.00	00.00	07.30	07.00	00.00	00	04	01.00	70.00	74	70.00	00.00	00	04
Σ	000.00	007.3	000.00	004.00	000.0	004.00	037.00	014.2	701.70	720.07	711.0	007.3	041.00
Promedio	00.00	00.73	00.00	00.40	00.00	00.40	03.70	01.42	70.17	72.00	00.73	00.73	04.10
d.s.	± 1.07	± 1.00	± 3.00	± 1.77	± 1.04	± 0.70	± 0.70	± 3.00	± 0.40	± 0.44	± 0.17	± 1.00	± 0.10

Todos los experimentos se realizaron como se describe en material y métodos en 10 diferentes ocasiones y se probaron por duplicado, en el Cuadro se expresan sus valores promedio, después de una incubación a 37°C por 30 min.

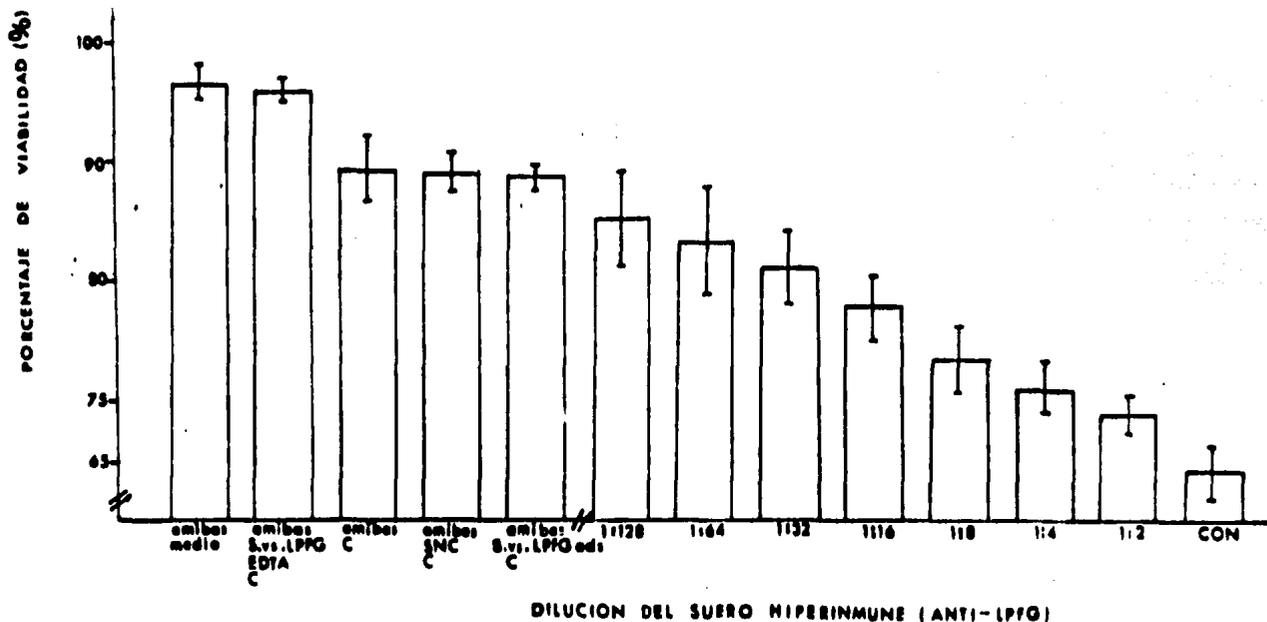
XV = Porcentaje de viabilidad; d.s. = desviación estandar; S. hiperinm. = Suero hiperinmune (anti-LPFG);

C = Complemento

S. hiperinm. ads. = Suero hiperinmune adsorbido

SNC = Suero Normal de Conejo.

Σ = sumatoria



GRAFICA 2: SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE *E. histolytica* A LA INCUBACION CON DILUCIONES DEL SUERO HIPERINMUNE (ANTI-LPFG)

Cada barra representa el promedio de 10 experimentos por duplicado
 Fueron incubados 30 min, a 37°C

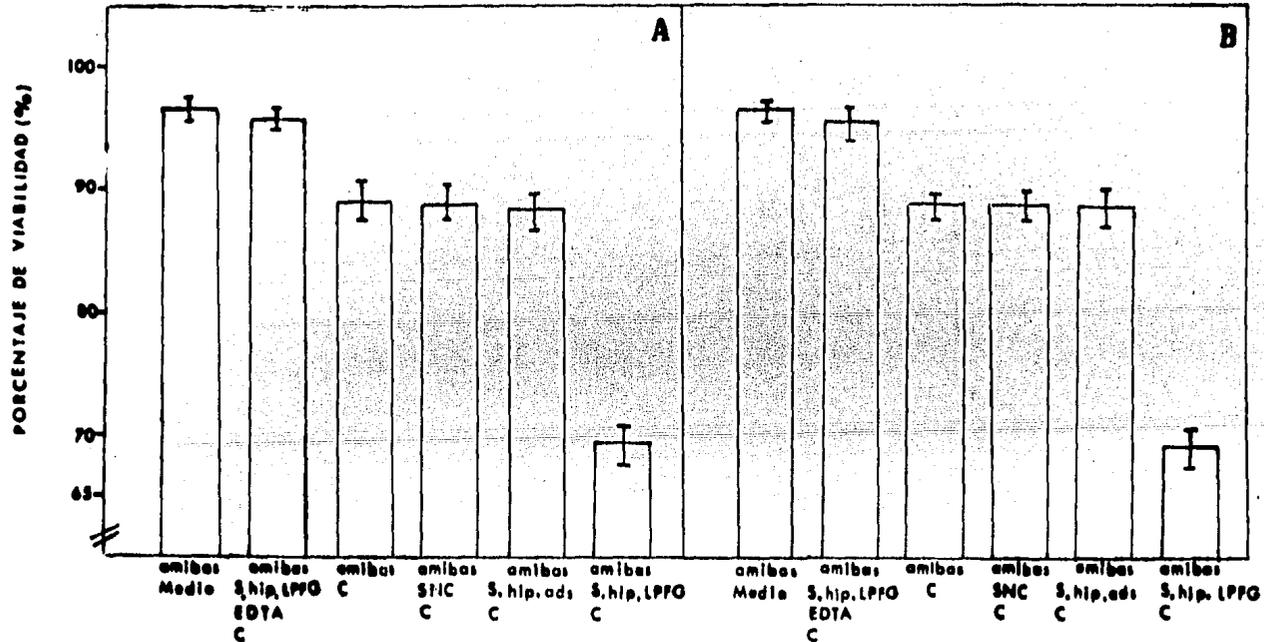
- S.vs.LPFG - Suero hiperinmune (anti-LPFG)
- S.vs.LPFG ads - Suero hiperinmune adsorbido
- SNC - Suero Normal de Conejo
- C - Complemento
- CON - Concentrado

SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE *E. histolytica* A LA INCUBACION
CON ANTICUERPOS FIJADORES DE COMPLEMENTO DIRIGIDOS CONTRA LPFG DE AMIBA.

Cuadro 5: SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE *Entamoeba histolytica* RESEMBRADOS
DESPUES DE UNA INCUBACION CON SUERO HIPERINMUNE (anti-LPFG)

	Trofozoitos E. h.	Trofozoitos E. h. S.hiperinm. EDTA C.	Trofozoitos E. h. C	Trofozoitos E. h. SNC C	Trofozoitos E. h. S.hiperinm. ada. C	Trofozoitos E. h. S.hiperinm. C
A	% V 97.33 96.66 96 97 96.33 96.66	% V 96.33 95.66 95 96 96 95.66	% V 88.33 89 90 89.33 87.66 88	% V 88.66 88.33 89.33 89.66 88 87.66	% V 88 88.33 89.33 88.66 87.66 87.33	% V 70.66 69.66 68.33 68.66 69.66 69.33
Σ	579.98	574.65	532.32	531.64	529.31	416.3
Promedio	96.66	95.77	88.72	88.60	86.21	69.38
d.s.	± 0.85	± 0.83	± 1.60	± 1.40	± 1.31	± 1.50
B	% V 96.33 96 96.66 96.33 96.66 97	% V 95 94.66 96.33 95.66 96.33 96.66	% V 88.66 88 89 89.66 88 88.33	% V 88.33 89 88.33 89.33 87.66 89	% V 88 87 88.66 88.33 89 89.66	% V 68.66 70.33 68 68.33 69 69.66
Σ	578.98	574.64	531.65	531.65	530.65	413.98
Promedio	96.49	95.77	88.60	88.60	88.44	68.99
d.s.	± 0.63	± 1.47	± 1.17	± 1.17	± 1.65	± 1.58

Todos los experimentos se realizaron como se describe en Material y Métodos en 6 diferentes ocasiones y se probaron por duplicado, en el Cuadro se expresan sus valores promedio, después de una incubación a -- 37°C min. A = Primera incubación con suero hiperinmune; B = Segunda incubación con suero hiperinmune; -- %V = Porcentaje de viabilidad; d.s. = Desviación estandar; s.hiperinm.=Suero hiperinmune (anti-LPFG); -- C' = Complemento; SNC = suero normal de conejo. Σ = sumatoria



GRAFICA 3: SUSCEPTIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE *E. histolytica* RESEMBRADA DESPUES DE UNA INCUBACION CON SUERO HIPERINMUNE (ANTI-LPFG)
 Cada barra representa el promedio de 6 experimentos realizados por duplicado
 Se incubaron 30 min a 37°C
 A: 1ª INCUBACION DE LOS TROFOZOITOS CON SUERO HIPERINMUNE + C
 B: 2ª INCUBACION DE LOS TROFOZOITOS CON SUERO HIPERINMUNE + C

S.hip.LPFG - Suero hiperinmune (anti-LPFG)
 SNC - Suero normal de conejo
 S.hip.ads - Suero hiperinmune adsorbido

A: Cuadro 6: TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

 $\text{Sin}^{-1}\sqrt{P}$

= Proporción de viabilidad

T_1											
x	x^2										
1.4066	1.9786	1.3780	1.8989	1.2221	1.4936	1.2273	1.5063	1.2170	1.4812	0.9983	0.9967
1.3870	1.9237	1.3609	1.8521	1.2327	1.5196	1.2221	1.4936	1.2221	1.4936	0.9874	0.9750
1.3694	1.8753	1.3452	1.8097	1.2490	1.5601	1.2380	1.5327	1.2380	1.5327	0.9730	0.9468
1.3780	1.8989	1.3694	1.8753	1.2118	1.4685	1.2170	1.4812	1.2118	1.4685	0.9874	0.9750
1.3870	1.9237	1.3609	1.8521	1.2170	1.4812	1.2118	1.4685	1.2068	1.4565	0.9838	0.9679
1.3967	1.9508	1.3694	1.8753	1.2380	1.5327	1.2434	1.5460	1.2273	1.5063	0.9766	0.9534
8.3247	11.551	8.1838	11.163	7.3706	9.0557	7.3596	9.0283	7.323	8.9388	5.9065	5.8148
1.3874	1.9251	1.3639	1.8605	1.2284	1.5092	1.2266	1.5047	1.2205	1.4898	0.9844	0.9691

- Donde:
- T_1 = Trofozoítos de E. h.
 - T_2 = Trofozoítos de E. h. + S.hiperinm. + EDTA + C
 - T_3 = Trofozoítos de E. h. + C
 - T_4 = Trofozoítos de E. h. + SNC + C
 - T_5 = Trofozoítos de E. h. + S.hiperinm. ads. + C
 - T_6 = Trofozoítos de E. h. + S.hiperinm. + C

En este Cuadro se muestra el tratamiento que se le hizo a los datos, para hacer más homogénea la muestra y posteriormente ser usados los datos para hacer el Análisis de Varianza.

La transformación se hizo para los datos del Cuadro 4; de la sección A.

Σ = Sumatoria

\bar{x} = Media

B) Análisis de Varianza.

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$$

$$H_1 = \mu_i \neq \mu_j$$

$$\alpha = 0.05$$

SC = Suma de cuadrados

$$N = n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_5 + n_6 = 6 (6) = 36$$

$$\sum x_{ij} = 44.4682$$

$$\sum x_{ij}^2 = 55.552$$

$$SC_{TOTAL} = \sum x_{ij}^2 - \frac{(\sum x_{ij})^2}{N}$$

$$SC_{TOTAL} = 55.552 - \frac{(44.4682)^2}{36} = 0.623644$$

$$SC_{ENTRE TRATAMIENTOS n_i} = \frac{\sum x_{ij}^2}{n_i} - \frac{(\sum x_{ij})^2}{N}$$

$$SC_{ET} = \frac{8.3247^2 + 8.1838^2 + 7.3596^2 + 7.323^2 + 5.9065^2 + 7.3706^2}{6} - \frac{(44.4682)^2}{36} = 0.617934184$$

$$SC_{TOTAL} = SC_{ET} + SC_{DE ERROR}$$

$$SC_{DE} = SC_{TOTAL} - SC_{ET}$$

$$SC_{DE} = 0.623644 - 0.617934184 = 5.7098 \times 10^{-3}$$

Variaciones	SC	Grados de libertad	Media de cuadrados
Entre Tratamientos	0.617934	5	0.123586
De Error	5.7098×10^{-3}	30	1.9032×10^{-4}
Total	0.623644		

Grados de libertad:

$$\text{Entre tratamientos} = a - 1 \Rightarrow 6 - 1 = 5$$

$$\text{De Error} = N - a \Rightarrow 36 - 6 = 30$$

$$\text{Total} = N - 1 \Rightarrow 36 - 1 = 35$$

$$F = \frac{\text{Media de cuadrados ET}}{\text{Media de cuadrados DE}} = \frac{0.123586836}{1.9032 \times 10^{-4}} = 649.3633$$

$$F_{\text{tablas}} = 2.53$$

Si $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}} \therefore$ se rechaza H_0

649.3633 $>$ 2.53 $\therefore H_0$ se rechaza

Por lo tanto vemos que la hipótesis nula se rechaza, o sea, hay diferencias entre los tratamientos dados a las muestras, pero no sabemos específicamente en cual, por lo que se realizó el método de comparaciones múltiples "Tukey" para ver en cual de los tratamientos había una diferencia estadísticamente significativa.

C) Comparaciones múltiples por el método "Tukey".

$$MC_{DE} = SC_{DE} \div G.L. = 5.7098 \times 10^{-3} \div 30 = 1.9032 \times 10^{-4}$$

$$S \bar{x}_i = \sqrt{\frac{MC_{DE}}{n}} = \sqrt{\frac{1.9032 \times 10^{-4}}{6}} = 5.6320 \times 10^{-3}$$

La media (\bar{x}) de los tratamientos se ordenan descendente quedando de la siguiente manera:

$\bar{x}_1 = 1.38745$	Trofozoítos de <u>E. histolytica</u>
$\bar{x}_2 = 1.3639$	T. de <u>E. h.</u> + S.hiper. + EDTA + C
$\bar{x}_3 = 1.2284$	T. de <u>E. h.</u> + C
$\bar{x}_4 = 1.2266$	T. de <u>E. h.</u> + SNC + C
$\bar{x}_5 = 1.2205$	T. de <u>E. h.</u> + S.hiper. ads. + C
$\bar{x}_6 = 0.9844$	T. de <u>E. h.</u> + S.hiper. + C

Diferencia mínima significativa honesta = DMSH

$$DMSH = (S \bar{x}_i) (q_{0.05})$$

G.L.

Si la diferencia entre \bar{x}_a y \bar{x}_b es mayor que DMSH hay una diferencia estadísticamente significativa.

a) \bar{x}_1 y \bar{x}_3

$$S \bar{x}_i = 5.6320 \times 10^{-3}$$

$$q = 3.44$$

$$DMSH = 5.6320 \times 10^{-3} \times 3.44 = 0.01937$$

$$\bar{x}_1 - \bar{x}_3 = 1.38745 - 1.2284 = 0.15905$$

$$0.15905 > 0.01937$$

Hay una diferencia estadísticamente significativa entre, trofozoítos de E. h. y trofozoítos de E. h. + C.

b) \bar{x}_2 y \bar{x}_3

$$S\bar{x}_1 = 5.6320 \times 10^{-3}$$

$$q = 2.86$$

$$DMSH = 5.6320 \times 10^{-3} \times 2.86 = 0.01610$$

$$\bar{x}_2 - \bar{x}_3 = 1.3639 - 1.2284 = 0.1355$$

$$0.1355 > 0.01610$$

Hay una diferencia estadísticamente significativa entre, trofozoítos de E. h. + S.hiper. + EDTA + C y trofozoítos de E. h. + C.

c) \bar{x}_3 y \bar{x}_4

$$S\bar{x}_1 = 5.6320 \times 10^{-3}$$

$$q = 2.86$$

$$DMSH = 5.63 \times 10^{-3} \times 2.86 = 0.01610$$

$$\bar{x}_3 - \bar{x}_4 = 1.2284 - 1.2266 = 1.8 \times 10^{-3}$$

$$1.8 \times 10^{-3} < 0.01610$$

No hay una diferencia estadísticamente significativa entre, trofozoítos de E. h. + C y trofozoítos de E. h. - + SNC + C

d) \bar{x}_3 y \bar{x}_5

$$S\bar{x}_1 = 5.6320 \times 10^{-3}$$

$$q = 3.44$$

$$DMSH = 5.6320 \times 10^{-3} \times 3.44 = 0.1937$$

$$\bar{x}_3 - \bar{x}_5 = 1.2284 - 1.2205 = 7.9 \times 10^{-3}$$

$$0.0079 < 0.1937$$

No hay una diferencia estadísticamente significativa entre, trofozoítos de E. h. + C y trofozoítos de E. h. + S.hiper. adsc. + C.

e) \bar{x}_5 y \bar{x}_6

$$s_{\bar{x}_1} = 5.6320 \times 10^{-3}$$

$$q = 2.86$$

$$DMSH = 5.6320 \times 10^{-3} \times 2.86 = 0.01610$$

$$\bar{x}_5 - \bar{x}_6 = 1.2205 - 0.9844 = 0.2361$$

$$0.2361 > 0.01610$$

Hay una diferencia estadísticamente significativa entre, trofozoitos de E. h. + S.hiper. ads. + C y trofozoitos de E. h. + S.hiper. + C

6. MICROSCOPIA ELECTRONICA



Fig. 3 TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica DESPUES DE LA INTERACCION CON SUERO HIPERINMUNE ADSORBIDO. La interacción se hizo por 30 min a 37°C, se centrifugó la muestra y el paquete se fijó con fijador Universal. Se trató la muestra para microscopía de transmisión (x 3000).

➡ Secuencia de la membrana plasmática de los trofozoitos de E. histolytica.

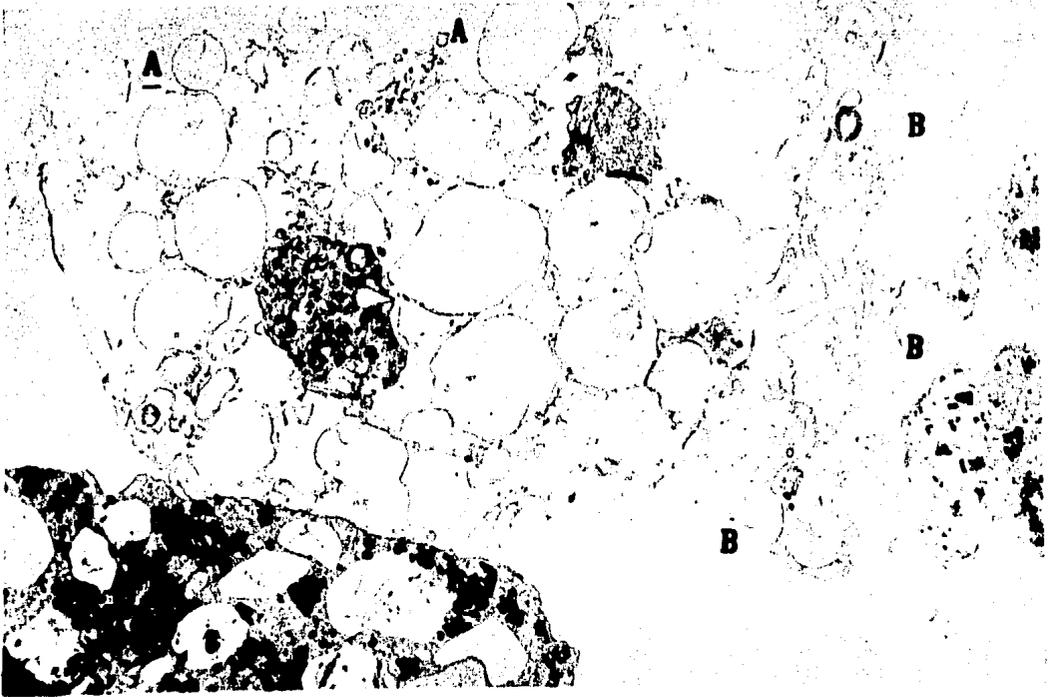


Fig. 4: TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica DESPUES DE LA INTERACCION ---
CON SUERO HIPERINMUNE (anti-LPFG). La interacción se hizo por 30 min a 37°C, se
centrifugó la muestra y el paquete se fijó con Fijador Universal. Se trató la -
muestra para microscopía de transmisión. (x 3000).

A = hay rompimiento de membrana plasmática de los trofozoitos de E. histo-
lytica.

B = fracciones celulares de trofozoitos de E. histolytica.

DISCUSION

Los resultados de la hemaglutinación pasiva demostraron la presencia de anticuerpos (clase IgG e IgM) anti-LPFG en el suero del conejo inmunizado y no encontramos anticuerpos hemoaglutinantes en el suero normal de conejo, comprobándose que esta molécula es inmunogénica, como se menciona en estudios previos (24).

Tomando en cuenta que la LPFG está en la superficie de trofozoítos de Entamoeba histolytica, y es inmunogénica, encontramos en suero de conejo anticuerpos de clase IgG o IgM, dirigidos contra la misma, estos podrían fijar complemento por la vía clásica, por lo que pensamos poner en contacto trofozoítos de Entamoeba histolytica más suero hiperinmune anti-LPFG y una fuente de complemento (suero de cobayo).

Para esto se ajustó a un número constante de trofozoítos 5×10^4 , para tener una cantidad más uniforme de antígeno presente. Los trofozoítos una vez cosechados se mantuvieron en medio TYI-S-33, ya que en éste, se mantenían en mejores condiciones, y como el parámetro a utilizar en este experimento es el porcentaje de viabilidad se tiene que evitar algún otro factor que pudiera estar disminuyendo la viabilidad de los trofozoítos.

Por otra parte el suero de cobayo, se utilizó en una dilución 1:30, debido a que en estudios previos (46), se demostró que utilizando el suero diluido no se activa la vía alterna de complemento por lo que si encontrabamos muerte de trofozoítos sería exclusivamente por la activación de la vía clásica de complemento.

De la gráfica 1 y Cuadro 3 podemos ver que conforme pasa el tiempo hay una disminución de la viabilidad de las amibas, teniendo a los 60 min una diferencia de un 35% de viabilidad entre el suero hiperinmune y SNC. La diferencia que se observa entre SNC y suero hiperinmune más EDTA, es debida a que los tro-

fozoitos son capaces de activar la vía clásica del complemento en ausencia de anticuerpos (44), pero también se ha mencionado que aunque se activa la vía clásica del complemento por cepas patógenas de trofozoitos de Entamoeba histolytica éstas son capaces de evadir la lisis (48), podría ser que se está activando la vía clásica, y que existe lisis debido a que la cepa puede haber perdido patogenicidad, debido a los pases que se le han hecho. Cuando se utiliza el suero hiperinmune, más EDTA no se observa disminución de viabilidad, comparado cuando se utilizó el suero hiperinmune, esto es porque el EDTA es un agente quelante, secuestra el calcio presente, y no activa la vía clásica del complemento, ya que esta es dependiente de calcio (51). No se probó aumentar el período de incubación, pero pensamos que si prolongamos el tiempo va a disminuir más el porcentaje de viabilidad ya obtenido a los 60 min, que era del 51.39%.

Se puede ver también que la viabilidad se ve disminuida conforme aumenta la cantidad de anticuerpos presentes en el suero hiperinmune, como se observa en la gráfica 2. No se encuentran diferencias entre la viabilidad de las amibas en medio de cultivo y las amibas con suero hiperinmune más EDTA, por lo que se comprueba que al usar EDTA se está inactivando la vía clásica del complemento. Por otro lado vemos que en las amibas más C; amibas más SNC más C; amibas más suero hiperinmune adsorbido (para ver especificidad de anticuerpos) existe una disminución de viabilidad comparada con las amibas en medio de cultivo debida, como ya se mencionó, a la capacidad de los trofozoitos de activar la vía clásica del C.

Se ha reportado que los trofozoitos de Entamoeba histolytica se hacen refractarios a la incubación con anticuerpos y C (48), por lo que éste podría ser un mecanismo de evasión de la respuesta inmune. Para probar lo anterior se hizo una segunda incubación de amibas con el suero hiperinmune anti-LPFG y C y en la gráfica 3 se observa que siguen siendo sensibles, ya que existe el mismo porcentaje de viabilidad que en la primera incubación de las amibas con el suero -

hiperinmune y C. También se puede ver que hay una diferencia estadísticamente significativa entre amibas más C y amibas más suero hiperinmune más EDTA, lo que refuerza otra vez que los trofozoítos son capaces de activar la vía clásica del C, en ausencia de anticuerpos. No existiendo diferencias estadísticamente significativas entre amibas más C; amibas más C más SNC; amibas más suero hiperinmune adsorbido más C; por lo que vemos que existe la activación de C en ausencia de anticuerpos. Finalmente vemos que hay una diferencia estadísticamente significativa entre amibas más suero hiperinmune más C y amibas más suero hiperinmune adsorbido más C, lo que indica que este efecto es debido a la formación del complejo Ag-Ac y activación del C, o sea que es un efecto debido a la presencia de anticuerpos específicos contra el Ag de superficie LPFG.

El criterio de viabilidad usado fue por el método de exclusión de azul de tripan, donde las células se tiñen cuando su membrana está dañada, sin embargo esta prueba tiene ciertos inconvenientes, ya que se ha observado que algunas células no se tiñen completamente por lo que es difícil indicar si la célula está o no muerta. En vista de ello se realizó microscopía electrónica, para tener un parámetro de comparación.

En la fig. 3 y 4 se muestra que existen diferencias entre los trofozoítos incubados con suero hiperinmune y suero hiperinmune adsorbido, observándose que existe un efecto lítico sobre los primeros.

Debemos también mencionar, que, se sugiere hacer más estudios para corroborar estos experimentos, como lo sería el de utilizar los anticuerpos purificados, así como comparar el efecto de estos anticuerpos y anticuerpos dirigidos contra proteínas de membrana, por ejemplo. También sería valioso comparar el efecto con cepas no patógenas, ya que en este experimento sólo se utilizó la cepa HMI-IMSS (cepa patógena). También sugerimos hacer estudios para comprobar la actividad de la amiba, ya que al utilizar el método de exclusión con azul de tripan, sólo vemos viabilidad pero no sabemos si funcionalmente está viva la ami

ba, se recomienda la prueba de eritrofagocitosis.

CONCLUSIONES

La molécula LPFG induce producción de anticuerpos de clase IgG, IgM e IgA (24, 34).

Estos anticuerpos forman un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie de la amiba, y son capaces de activar la vía clásica del complemento, disminuyendo la viabilidad conforme pasa el tiempo y aumenta la cantidad de anticuerpos presentes en el suero hiperinmune, por lo que estos anticuerpos podrían tener una función protectora en el hospedero.

Aunque en estudios previos se ha sugerido que cepas patógenas son capaces de evadir la lisis por complemento, en este trabajo se observa que los anticuerpos pueden activar la vía clásica del complemento y llegan a morir, ya que se encuentran diferencias estadísticamente significativas usando amibas más suero hiperinmune más C y amibas más suero hiperinmune más EDTA más C, donde en éste último se inactiva la vía clásica del complemento.

Por otro lado vemos que el efecto refractario de las amibas a C y anticuerpos no se observa, ya que se obtuvo igual porcentaje de viabilidad en la primera y la segunda incubación de los trofozoitos con suero hiperinmune y C, sin embargo se sugiere realizar más estudios para corroborar estos experimentos.

Se sabe también que la amiba es capaz de activar C por la vía alterna (45, 46), por lo que pensamos que esta molécula (LPFG), tenga participación en la activación, debido a que como ya se sabe moléculas de lipopolisacárido son capaces de activar la vía alterna del complemento.

La viabilidad de las amibas se confirmó al utilizar la microscopía electrónica, donde se observó que la membrana plasmática no estaba íntegra y se provocó la lisis de ésta, como fue observado al utilizar el método de exclusión de azul de tripan.

APENDICE

a) ABREVIATURAS.

EDTA	ácido etilendiamino tetracético
PBS	amortiguador salino de fosfatos
Ac	anticuerpo
Ag	antígeno
cm	centímetros
C	complemento
GRC	glóbulos rojos de carnero
°C	grados centígrados
g	gramos
hrs	horas
LPFG	Lipopeptidofosfaglicana
l	litros
µg	microgramos
µm	micrómetros
µl	microlitros
ml	mililitros
min	minutos
nm	nanómetros
N	normal
rpm	revoluciones por minuto
SAB	solución amortiguadora de barbital
SSF	solución salina fisiológica
SNC	suero normal de conejo
v/v	volumen a volumen

b) REACTIVOS

Solución Salina Fisiológica 0.85% (SSF)

Cloruro de Sodio..... 8.5 g
Agua aforar a..... 1.0 l

Solución Alsever

Dextrosa o Glucosa..... 2.05 g
Citrate de Sodio..... 0.08 g
Cloruro de Sodio..... 0.42 g
Acido Cítrico..... 0.055 g
Agua c.b.p..... 100 ml
Esterilizar a 10 lb, 10 min

Amortiguador Salino-Fosfatos pH 7.4 (PBS)

Cloruro de Sodio..... 8.0 g
Fosfato de Potasio Monobásico..... 0.2 g
Fosfato de Sodio Dibásico..... 1.15 g
Cloruro de Potasio..... 0.2 g
Agua c.b.p..... 1.0 l

Medio TYI-S-33

Peptona Biotripticasa..... 2.6 g
Dextrosa..... 1.0 g
Cloruro de Sodio..... 0.2 g
Fosfato de Potasio Monobásico..... 0.06 g
Fosfato de Potasio Dibásico..... 0.1 g
Cisteína..... 0.1 g
Acido Ascórbico..... 0.02 g
Citrate Férrico de Amonio..... 0.00228 g
Agua..... 87 ml

Se ajustó el pH a 6.8 con hidróxido de sodio 1 N, se filtró usando papel - Whatman # 1 y se esterilizó 15 lb, 121°C por 15 min. Antes de ser usado se adicionaron por cada 75 ml de medio 15 ml de suero bovino (Biorad) descomplementado y 3 ml de mezcla vitamínica (Biorad).

Azul de Tripán 0.3%

Azul de tripán..... 0.3 g
SSF 0.85% aforar a..... 100 ml

Solución Amortiguadora de Barbital (SAB)

Cloruro de Sodio..... 4.5 g
Ac. 5-5' dietilbarbitúrico..... 0.28 g
5-5' dietilbarbiturato de sodio..... 0.18 g
Cloruro de Magnesio..... 0.05 g
Cloruro de Calcio..... 0.01 g
Agua c.b.p..... 100 ml

Antes de ser usado se diluye 1/5

Fijador Universal

Fosfato de Sodio Monobásico..... 1.16 g
Hidróxido de Sodio..... 0.27 g
Agua..... 88 ml
Formol (reactivo 40%)..... 10 ml
Glutaraldehído (25%)..... 4 ml

BIBLIOGRAFIA

- 1.- W.H.O. Expert Committee: Amoebiasis Technical Report Series; 1969, No. 421, p. 5-52.
- 2.- Ortiz-Ortiz Librado, Garmilla C., Zamacona G.R., Ortiz Ortiz L.: Hiper sensibilidad celular en amibiiasis II. Estudios en pacientes con absceso hepático amibiano agudo; Arch. Invest. Med. (Méx); 1973, 45, p.191.
- 3.- Mc. Laughlin J., Lindmark, D.G., Mueller, M.: Membrane bound phosphatases in E. histolytica; Arch. Invest. Med. (Méx); 1978, 9 (Suppl), p.141-148.
- 4.- Gutierrez Trujillo G.: Características principales de la amibiiasis invasora en el niño; Arch. Invest. Med. (Méx); 1980, 11 (Suppl), s 281- s 286.
- 5.- Bautista J.: Tratamiento quirúrgico de las complicaciones de la amibiiasis invasora; Arch. Invest. Med. (Méx); 1978, 9 (Suppl), s411-2415.
- 6.- Levine N.D., Corliss J.C., Cox F.E.G., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedele G.F., Leoblich A.R.: A newly revised classification of the protozoa; J. Protozool.; 1980, 27, p. 37-58.
- 7.- Martínez Palomo A.: The biology of Entamoeba histolytica.; 1982; - - - Research Studies Press. A division of John Wiley. I Sms. LTD.; Chichester N.Y. Brisbane; Toronto Singapore; p. 1-290.
- 8.- Smith J.W., Mc. Quay R.M., Ash L.R., Melvin D.M., Orihel T.C., Thompson J.H.: Diagnostic medical parasitology: intestinal protozoa; American Society of Clinical Pathologists., 1979, Education Products Division, United States, p, 1-130.
- 9.- Griffin J.E. Juniper k.: Ultrastructure of Entamoeba histolytica form human Amebic Dysentery; Arch. Path.; 1971, 21, p. 271-280.
- 10.- Miller J.H., Swartzwelder, J.C., Deas J.E.: An electron microscopic study of Entamoeba histolytica; J. Parasitol. 1961, 47, p. 577-587.
- 11.- Rosenbaum R.M., Wittner M.: Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of Entamoeba histolytica with particular reference to helical bo-

dies; J. Cell Biol.; 1970, 45, p. 367 - 382.

12.- Fletcher K.A., Maegraith, B.G., Jarumilinta R.: Electron microscope - studies of trophozoites of Entamoeba histolytica; Ann. Trop. Med. Parasitol.; - 1962, 56, p. 496-499.

13.- El-Hashimi, W. Pittman F.; Ultrastructure of Entamoeba histolytica - trophozoites obtained from the colon and from in-vitro cultures; Am. J. Trop. Med. Hyg.; 1970, 30, p. 215-226.

14.- Pittman F.E., El-Hashimi W.K., Pittman J.C.: Studies of human amebiasis II. Light and electron microscopic observations of colonic mucosa and exudate in acute amebic colitis; Gastroenterology; 1973, 65, p. 588-603.

15.- Lushbaugh, E.B., Miller J.M.: Fine structural topochemistry of Entamoeba histolytica; J. Parasitol.; 1974, 60, p. 421-433.

16.- Martínez Palomo A., Gonzalez Robles A., Chavez de Ramirez B.: Ultrastructure studies of various Entamoeba strains.: In B. Sepulveda and L.S. Diamond (ed). Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, 1976, p. 226-237.

17.- Aust-Kettis, Lidman K., Fagraeus A.: Actin in Entamoeba histolytica - trophozoites revealed by human actin antibodies.; J. Parasitol.; 1977, 63, p. - 581-583.

18.- Report of a WHO Scientific Group.: Intestinal protozoan and helminthic infections.; W.H.O. Tech. Rep. Ser. 1981, p.666.

19.- Diamond L.S.: Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica- like amebae; J. Parasitol.; 1968; 54, p. 1047.

20.- Ravdin Jonathan.: Pathogenesis of Disease caused by Entamoeba histolytica: Studies of adherence, secreted Toxins, and Contact-dependent cytolysis; - Reviews of Infectious Diseases; 1986, 8, No. 2, p. 247-260.

21.- Jiménez C.E., Soto J.D., Kumate J., Ortiz B.: Purificación parcial de algunos antígenos de superficie de E. histolytica. Investigación de la activi--

dad biológica frente a sueros de pacientes con absceso hepático amibiano.; - -
Arch. Invest. Med. (Méx), 1982, 13 (Suppl), p. 281.

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

23.- Isibasi A., Cruz M.S., Soto Montano X., Ramírez A., Kumate J.: Localización en los trofozoitos de Entamoeba histolytica de una lipopeptidofosfoglica na extraída por fenol-agua de la cepa HK-9 cultivada en medio axénico. IX Seminario sobre Amibiasis, Resúmenes, México, 1981, 8.

24.- Isibasi A., Sánchez N.M., García F., Kumate J.: Serología con polisacáridos de Entamoeba histolytica; Arch. Invest. Med. (Méx); 1978, 9 (Suppl), - p. 285.

25.- Isibasi A., Cruz M.S., Ramírez A., Kumate J.: Inmunoquímica de una -- lipopeptidofosfoglicana extraída de trofozoitos de Entamoeba histolytica cepa - HK-9 cultivados en medio axénico, utilizando el método de fenol-agua; Arch. -- Invest. Med. (Méx); 1982, 13 (Suppl 3), p. 51.

26.- Triss D., Martínez-Palomo A., Arguello C., de la Torre Margarita, de la Hoz Rafael.: Surface properties related to Concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several Entamoeba strains; J. Exp. Med.; 1977, - - 145, p. 652-665.

27.- Calderón J., M. Ma. de Lourdes, Acosta H.M.: Surface redistribution - and release of antibody induced caps in Entamoebae; J. Exp. Med.; 1980, 151, -- p. 184-193.

28.- Kobiler D. and Mirelmar D.: Lectin Activity in Entamoeba histolytica trophozoites.; Infection and immunity; 1980, 29, p. 221-225

29.- Krupp, I.M.; Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis.; Am. J. Trop. Med. Hyg.; 1970, 19, p. 57-62.

30.- Haely G.R., Visuesuara G.S., Kagan I.G.: Observations on the persistence of antibodies to Entamoeba histolytica; Arch. Invest. Med. (Méx); 1974, -

31.- Capín N.R., Ortíz L., Zamacona G.R., Aubanel M.: Efectos del mercap--
toetanol en las reacciones serológicas de la amibiasis invasora; Arch. Invest.-
Med. (Méx), 1973, 2, p. s177.

32.- Arellano M.T., Ortíz-Ortíz L: Algunas propiedades de la globulina es-
pecífica del suero de pacientes con absceso hepático amibiano; Arch. Invest. --
Med. (Méx), 1974, 5, p. s487.

33.- Acosta G., Barranco C., Isibasi A., Campos R., Kumate J.: Excreción -
de anticuerpos de clase IgA específicos antiameba en bilis de ratas inmunizadas
con trofozoitos de Entamoeba histolytica cultivados en medio axénico; Arch. --
Invest. Med. (Méx); 1982, 13, p. s255.

34.- Acosta G., Torres E., Meraz E., Isibasi A., Kumate J.: Búsqueda de -
anticuerpos de clase IgA dirigidos contra un lipopolisacárido de Entamoeba his-
tolytica en muestras de calostro humano; Memorias del X seminario de Amibiasis,
Arch. Invest. Med.; Oct. 1986.

35.- Martínez Cairo S., Gorab A., Muñoz O., Reyes M.; Coproanticuerpos en
amibiasis intestinal invasora; Arch. Invest. Med. (Méx); 1979, 10, p. 121-126.

36.- Harris W.G., Friedman M.J., Bray R.S.; Serial measurement of total -
and parasite specific IgE in an African population infected with Entamoeba his-
tolytica; Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1978, 72, p. 427.

37.- Stevens D.L., Taylor R.G., Everett E.D., Owensby L. Mc. Alitt T.R.; -
Amebic liver abscess. Report of a case presenting with nonreactive serologic --
tests for Entamoeba histolytica; Am. J. Gastroenterol.; 1979, 72, p.234-238.

38.- Salata R., Ravdin J.: Review of the human immune mechanisms directed
against Entamoeba histolytica; Reviews of infectious diseases; 1986, 8, p.261-
272.

39.- Bellanti J. A.: Immunology Basic Processes; W.B. Saunders Company, --
1985, 2nd. Edition., N.Y., p. 1-540.

40.- Joiner K.A., Brown E.J., Frank M.M.: Complement and Bacteria, Chemistry and biology in host Defense; Ann Rev Immunol; 1984, 2, p. 461-463.

41.- Ortiz-Ortiz L., Capín R., Capín NR., Sepúlveda B., Zamacona G.: Activation of the alternative pathway of complement by Entamoeba histolytica; Clin. Exp. Immunol.; 1978, 34, p. 10-18.

42.- Sepúlveda B., Chávez A., Iturbe A., Ortiz-Ortiz L.: Efecto de la gammaglobulina inmune antiambiiana sobre trofozoitos de Entamoeba histolytica; --- Arch. Invest. Med. (Méx); 1973, 4 (Suppl 1), p. s79-86.

43.- Ahmad S., Bisati S.: In vitro interaction between Entamoeba histolytica and humoral antibodies. In B. Sepúlveda and L. S. Diamond. Amebiasis. Proceedings of the international conference on Amebiasis IMSS, Méx. City, 1976, - p. 540-545.

44.- Calderón J., Schreiber R.: Activation of the Alternative and classical complement pathways by Entamoeba histolytica; Infection and Immunity; 1985, 50, p. 560-565.

45.- Capín N., Jiménez M, Zamacona G., Ortiz Ortiz L.: Determinación de -- complemento y vía alterna del Complemento en pacientes con absceso hepático amibiano; Arch. Invest. Med. (Méx); 1978, 9 (Suppl), p. 297-302.

46.- Capín N., Capín R., Zamacona G., Ortiz-Ortiz L.: Activación de la vía alterna del complemento por varias cepas axénicas de Entamoeba histolytica; - - Arch. Invest. Med. (Méx), 1978, 9 (Suppl 1), p. 291-296.

47.- De la Torre M., Ortiz-Ortiz L., De la Hoz R., Sepúlveda B.: Acción -- de suero humano inmune y de la gammaglobulina antiambiiana sobre cultivos de -- Entamoeba histolytica; Arch. Invest. Med. (Méx); 1973, 4 (Suppl 1), p. s67-s70.

48.- Sharon L. Reed., Curd J.G., Gigli I., Gillin F., Braude A.: Activa-- tion of complement of pathogenic and nopathogenic Entamoeba histolytica; The -- J. Immunol.; 1986, 136, p. 2265.- 2270.

49.- Bartlett.: The use of Transformations; Biometrics, 1947, 3, p.39-52.

50.- Montgomery D.C.: Design and Analysis of Experiments, 2nd. Edition, --
John Wiley & Sons., Copyright 1976, 1984 by John Wiley & Sons, Inc., N.Y., p.1-960.

51.- Nelson R.A.: The Complement System; The Inflammatory Process; Acade--
mic Press; 2nd. Edition; New York and London, p. 1-870.