

20
Zey



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

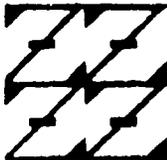
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

FALLA DE ORIGEN

REACCION CRUZADA ENTRE
LIPOPEPTIDOFOSFOGLICANO (LPFG) Y UNA
GLUCOPROTEINA DE MEMBRANA (GM) DE
APROXIMADAMENTE 30-35 KD DE
Entamoeba histolytica



UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUBIERO SÍ
DE NUESTRA DEFLESION

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

MARISELA LINARES CAÑAS

MEXICO, D. F.

1995



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES. ZARAGOZA.

CARRERA: BIOLOGO

TESIS.

REACCION CRUZADA ENTRE LIPOPEPTIDOFOSFOGLICANO (LPFG) Y UNA
GLUCOPROTEINA DE MEMBRANA (GM) DE APROXIMADAMENTE 30-35 KD DE
Entamoeba histolytica.

AREA: INMUNOLOGIA.

PRESENTA: MARISELA LINARES CAÑAS.

DIRECTOR DE TESIS: QFB. CONCEPCION AGUNDIS MATA

ASESOR INTERNO: QFB. ARACELI GARCIA DEL VALLE

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN:
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION DEL
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE DE LA
SECRETARIA DE SALUD Y SE CONCLUYO
EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DE
LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO.

A DIOS POR LO QUE
SIGNIFICA PARA MI

A MIS PADRES Y HERMANA
POR TODA SU COMPRENCION
Y SU APOYO

MUY ESPECIALMENTE A:
FABIOLA, SERGIO Y EDUARDO

AGRADESCO A:

QFB. CONCEPCION AGUNDIS MATA

POR HABERME BRINDADO ESTE

TRABAJO COMO PROYECTO DE TESIS

POR SU APOYO INCONDICIONAL

ACADEMICO Y MORAL

A:

OFB. ARACELI GARCIA DEL VALLE.

GRACIAS POR HABER ACEPTADO LA ASESORIA
INTERNA.

Y POR TODO EL APOYO BRINDADO PARA EL
MEJORAMIENTO DEL TRABAJO

A:

M. en C. GUADALUPE MALDONADO GARCIA

GRACIAS LUPITA POR TU APOYO.

POR TODO EL APOYO Y AYUDA

BRINDADA. GRACIAS A:

OBP. KARINA CHAVEZ RUEDA.

AGRADESCO A:

M. en C. FRANCISCO RETA MARES
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION
DEL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE.

DR. FRANCISCO BLANCO FABELA.
SECRETARIO PARTICULAR DE LA
CORDINACION DE INVESTIGACION
DEL IMSS.

POR EL APOYO BRINDADO

GRACIAS A TODO EL PERSONAL DEL
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION
DEL INSTITUTO NACIONAL DE
HIGIENE POR TODAS LAS ATENCIONES
Y APOYO.

JURADO:

PRESIDENTE: M C. RAUL ZAVALA CHAVERO.

VOCAL: QFB. CONCEPCION AGUNDIS MATA.

SECRETARIO: QFB. ARACELI GARCIA DEL VALLE.

SUPLENTE: QBP. FRANCISCO ALVARADO PEREZ.

SUPLENTE: IBQ. HILDA OLVERA DEL VALLE.

INDICE

RESUMEN -----	1
ANTECEDENTES -----	2
INTRODUCCION -----	5
JUSTIFICACION -----	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	22
OBJETIVOS -----	23
MATERIAL Y METODOS -----	24
RESULTADOS -----	46
ANALISIS DE RESULTADOS -----	62
CONCLUSIONES -----	68
LITERATURA CITADA -----	69

RESUMEN

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la participación de las fracciones carbohidratadas en la reacción cruzada entre los antígenos de membrana de Entamoeba histolytica: una glucoproteína de membrana (GM) de aproximadamente 30-35 kD de peso molecular y Lipopeptidofosfoglicano (LPFG). El antígeno GM se extrajo de cultivo axénico de amiba de 72 horas con un amortiguador de fuerza iónica alta e inhibidores de proteasas; mientras que el LPFG fue obtenido en un trabajo previo.

Por ELISA en placa se evaluó la reacción cruzada entre los antígenos, con sueros de paciente con Absceso Hepático Amibiano (AHA), suero anti-GM de ratón, sueros de conejo anti-membranas de amiba y monoclonales (3G7, 3H6, 2D8) contra GM que reconocen su porción carbohidratada, para la inhibición se emplearon 10 azúcares.

La ELISA para sueros y monoclonales demostró la reacción cruzada; la inhibición fue de más de 50 % con N- acetil- D- glucosamina, α- metil- D- glucósido y N- acetil- D- galactosamina y menor con los demás azúcares. Se concluye que estos carbohidratos son inmunodominantes para ambas moléculas.

Por otra parte también se identificó por microscopía electrónica el antígeno GM de membrana empleando el anticuerpo monoclonal 3G7.

ANTECEDENTES

En 1875 Lesh descubrió al protozooario Entamoeba histolytica en las heces de un enfermo con disenteria crónica en San Petesburgo actualmente Leningrado Rusia; y aunque estas amibas causaron disenteria cuando se inocularon en perros, Lesh no adjudicó al parásito ser el agente causal. El papel patológico de las amibas fue demostrado por varios investigadores, Kartulis en 1887 con trabajos en Egipto describió la existencia de lesiones del hígado por amibas. En 1891 Councilman y Laflaur describieron la disenteria amibiana y el absceso hepático amibiano. Quincks y Ross en 1893 describieron los quistes y en 1903 Schaudin da a la especie el nombre de Entamoeba histolytica diferenciándola de la amiba que generalmente se encuentra en el colon Entamoeba coli, la cual es un comensal inocuo del intestino grueso (1). El nombre de Entamoeba histolytica es dado por su supuesto efecto lítico sobre los tejidos, esta amiba es patológica mientras que Entamoeba coli no lo es.

Para estudiar la participación del sistema inmune en la amibiasis es necesario definir cuales antígenos de Entamoeba histolytica son reconocidos durante la infección. Desde que se logró cultivarla en medio axénico (2) se sentaron las bases para la separación y el estudio de las características inmunológicas de estos antígenos.

Las células se ponen en relación con su ambiente por medio de su superficie, es por ésto que la investigación se ha dirigido hacia el estudio integral de la membrana celular, es decir al estudio de las proteínas y lípidos que ahí se encuentran. En base al estudio de ciertos determinantes antigénicos en células animales y en bacterias, algunas investigaciones se han orientado a buscar otros elementos constitutivos en las membranas celulares, así en la década de los sesentas se acumuló valiosa información acerca de la presencia de mucopolisacáridos en las mismas y se llegó a la conclusión de que estas sustancias (que en términos de peso constituyen una pequeña proporción de los elementos moleculares de la membrana) en su función, son de primordial importancia ya que están relacionados con las características de adhesividad y antigenicidad de la membrana celular (3).

Existen ejemplos detallados sobre la presencia y composición de las moléculas polisacarídicas en los protozoarios: entre ellos Von Brand y col. en 1959 y Cosgrove en 1962 describieron la presencia de polímeros que contenian galactosa tanto en Trypanosoma cruzi

como en Crithidia fasciculata(4,5). Gottlieb y colaboradores en 1972 caracterizaron un polisacárido en la fase acuosa de los extractos fenólicos de Crithidia fasciculata y en 1977 publicaron la obtención de un antígeno polisacarídico de Tripanosoma cruzi aislado también de la fase acuosa de sus extractos fenólicos, este tipo de polisacárido se encuentra presente tanto en la membrana celular como en la superficie del Tripanosoma cruzi (6,7). Lederkremer y colaboradores en 1976 describieron la presencia de una lipopéptidofosfoglicana derivada también de Tripanosoma cruzi (8). Desde 1976 Korn y colaboradores han descrito el aislamiento, función y composición de una lipofosfoglicana, macromolécula que constituye el 31% de la membrana plasmática de Acanthamoeba castellanii (9,10,11).

En Entamoeba histolytica la membrana plasmática de los trofozoitos tiene un grosor aproximado de 10 nm, esta membrana se encuentra cubierta en su parte externa por un glicocálix o cubierta superficial, cuya presencia se ha demostrado con el uso de reactivos citoquímicos como el rojo de rutenio o el azul de alciano que aumentan la densidad electrónica de los componentes de la membrana que contienen carbohidratos, según descubrieron Lushbaugh y Miller en 1974 (12), y Pinto da Silva y colaboradores en 1975 (13); el estudio de esta cubierta es de particular interés por que probablemente contiene alguno de los antígenos amibianos que son reconocidos como extraños por el hospedero durante el establecimiento de la amibiasis invasiva. Los estudios de Martínez Palomo y colaboradores, en 1973 mostraron que esta cubierta superficial debe contener residuos de manosa o de glucosa expuestos al exterior, ya que se observa la unión de la lectina Conavalina A a los trofozoitos amibianos (14). Trabajos previos realizados por Isibasi y colaboradores en 1976 y 1978 (15,16) informaron sobre la extracción de moléculas polisacarídicas de los trofozoitos de Entamoeba histolytica obtenidas por el método de Freeman-Staub. el estudio químico de estos polisacáridos demostró la presencia de azúcares neutros tales como la manosa, la galactosa y la glucosa, el estudio inmunológico de estos parásitos reveló que aunque reaccionaban con sueros de conejos inmunizados intraperitonealmente con trofozoitos vivos, en ninguno de los casos reaccionaban con los sueros de los pacientes con diagnóstico de amibiasis intestinal o hepática. A consecuencia de estos resultados se decidió cambiar la metodología de extracción de este tipo de moléculas y de esta manera verificar si los polisacáridos obtenidos jugaban algún papel dentro del mosaico antigénico de los trofozoitos amibianos. Así, extrajeron fracciones ricas en polisacáridos a partir de trofozoitos por el método de fenol-agua descrito por Westphal-Jann en 1965, sin embargo, el principal contaminante de la fracción

polisacárida era el glucógeno, el cual se eliminó al ser tratado con alfa y beta amilasas, obteniendo así un antígeno rico en polisacárido con un contenido final de 89% de azúcares totales. Este antígeno rico en polisacárido, resultó ser un componente importante de su membrana. (17,18).

En un principio, se tenía heterogenicidad en los aislados antigénicos debido a la metodología empleada, más el avance en la tecnología ha permitido que seaislen antígenos de superficie más específicos. El método propuesto por Aley (1980), sobre aislamiento de membranas de Entamoeba histolytica orientó la investigación al aislamiento y caracterización química e inmunológica de antígenos de superficie, otros antígenos, organelos membranosos y moléculas citoplasmáticas (19).

Se han identificado al menos 18 antígenos de superficie en Entamoeba histolytica por análisis de membrana. Pero aún son poco comunes los estudios de antígenos en relación a sus propiedades bioquímicas e inmunológicas (20).

INTRODUCCION

La amibiasis se puede definir como la condición de hospedar al protozoario Entamoeba histolytica (Schaudinn, 1903) con o sin manifestaciones clínicas (21). Bajo manifestación clínica la amibiasis es una infección parasitaria invasiva del colon causado por el protozoario Entamoeba histolytica.

A falta de una eficaz quimioterapia anti-amibica, la amibiasis constituye una importante causa de muerte; condiciones impropias de salud que imperan en países en vías de desarrollo son sólo una de las causas que hacen viable la presencia y permanencia de la infección (22).

Así la amibiasis invasiva en ciertas áreas de Africa, Asia y América Latina representa un problema de salud y por ende social de gran importancia, pues se estima que de 500 millones de personas que hospedan a Entamoeba histolytica en su tracto intestinal 40 millones desarrollarán la enfermedad invasiva y 40 mil morirán anualmente (23).

Entamoeba histolytica

Pertenece al filum protozoa (organismo unicelular) subfilum Sarcodina (presenta locomoción y se multiplica por división binaria), clase Rhizopoda (se enquistada y habita el canal intestinal), y al género Entamoeba. (24).

Su ciclo de vida es simple y directo, ya que no se ha demostrado la existencia de estadios sexuales, ni de hospederos intermedios; presenta una forma vegetativa móvil el trofozoito, que se caracteriza por ser elongado con lobopodios protusibles y un uroide formado por pliegues irregulares, se aloja en el contenido intestinal y se multiplica por fisión binaria. Bajo condiciones apropiadas (las cuales se desconocen) se diferencia en la forma inmóvil e infectiva, llamada quiste la cual se excreta y puede infectar nuevos huéspedes por vía oral (25).

Morfología. El trofozoito la forma móvil es muy sensible a los cambios fisicoquímicos del ambiente, variaciones locales en pH, osmolaridad y potencial redox pueden alterar la forma y motilidad de las células. Se multiplica mejor aunque no exclusivamente en condiciones anaerobias, hay dos formas de trofozoitos, la pequeña "minuta" o "diminuta" (10-20 μm) se encuentran en las heces no

disentéricas, la grande (20-60 μm) se presenta en casos de enfermedad invasora. Fuera del organismo los trofozoitos mueren, si son ingeridos los destruye el ácido gástrico.

El quiste la forma infectante, sobrevive a la desecación, congelación y pH ácido, son destruidos a temperaturas mayores de 55 °C y en agua hiperclorada, son redondos miden de 5-20 μm , tienen una membrana hialina hasta de 5 μm . Cuando tienen un núcleo y las características señaladas, se dice que se trata de un prequiste, cuando tiene dos núcleos quiste inmaduro. Las amibas tienen vacuolas de glucógeno, contienen además uno o más cromátides, si en la forma de quiste tienen 4 núcleos se llama quiste maduro. (26).

Citoplasma. - Se diferencia claramente en ectoplasma y endoplasma. El primero de aspecto claro se encuentra en varios canales fagocíticos y el segundo un complejo vacuolar granuloso y tisular relacionado con procesos de pinocitosis. Las vacuolas se producen por endocitosis por lo que la estructura de su membrana es asimétrica y su contenido variable, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Las diferentes poblaciones de vacuolas se distinguen por su forma, unas tienen el borde liso y otras crenado. La amiba presenta un sistema tubular que es un retículo membranoso compuesto por tubulos finos (26).

Citoesqueleto. Esta formado principalmente por microfilamentos de actina localizados en regiones especializadas en la formación de canales fagocíticos o macropinocíticos. Se han descrito filamentos gruesos, pero no se ha demostrado que sean de miosina. Además existen conglomerados de partículas cilíndricas, en forma de roseta que rodean una área del citoplasma, se encuentran en asociación con vacuolas y están limitados por una membrana (27).

Organelos

Entamoeba histolytica no presenta aparato de Golgi, retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias, centriolos, ni microtúbulos, los ribosomas se encuentran arreglados en formas diferentes en el trofozoito y en el quiste. En el quiste se encuentran ordenados en un patrón hexagonal que forma el cuerpo cromatoide y en el trofozoito se encuentran en arreglos helicoidales. Se ha visto que estas hélices pueden estar en asociación con vacuolas digestivas.

Núcleo

El núcleo se observa como una masa redondeada, presenta un cariosoma central o ligeramente axéntrico que se rodea de fibrillas

acromáticas que van del centro a la periferia del núcleo. El trofozoito presenta un solo núcleo, en el que éste se divide para dar origen a cuatro núcleos. A diferencia de otras células eucariontes, el núcleo de Entamoeba histolytica no se encuentra fijo y puede moverse libremente dentro del citoplasma. La membrana nuclear tiene forma de esfera con poros y la cromatina se presenta en agrupamientos en posición diversa en el nucleoplasma. El ADN se encuentra predominantemente en el centro del núcleo mientras que el ARN ocupa la periferia. Además, no se ha detectado la presencia de un nucléolo, pero existe un endosoma formado por una concentración de ADN en el centro del núcleo. La división nuclear es uno de los aspectos menos conocidos y se sabe que mientras se lleva cabo, no existe disolución de la membrana nuclear.

Membrana Plasmática .

La membrana de la ameba presenta variaciones cualitativas y cuantitativas en su composición con relación a las células de mamíferos. Está compuesta por un 60-70% de lípidos predominantemente fosfolípidos de etanolamina, en la fracción saponificable, y colesterol, en la no saponificable (29). Presenta aminoetilfosfonato, el cual probablemente tiene una función en la protección contra hidrolasas (30). En la membrana plasmática y vesículas intracelulares se ha encontrado un liposopeptidoglucano altamente antigénico (31). También contiene proteínas en un rango de 12 a 200 kD de peso molecular (19), muchas de las cuales son glucoproteínas (32). La fosfatasa ácida se encuentra unida a la membrana lisosomal, mientras que en otras células eucariontes es una proteína soluble dentro de lisosomas y vesículas secundarias. La Beta-D-glucosaminidasa lisosomal se halla tanto unida a la membrana como en forma soluble. Estudios de las proteínas de la membrana llevados a cabo con marcaje con lactoperoxidasa, interacción con la lectina Concanavalina A y marcaje con 5-iodonaftaleno-1-azida, han confirmado que la ameba posee glucocálix extenso constituido por glucoproteínas extrínsecas, probablemente ancladas con algunas proteínas transmembranales (19,33). En resumen se han identificado proteínas integrales en la membrana de Entamoeba histolytica con una gran proporción de proteínas solubles y algunas potencialmente ligadas a la estructura interna de la membrana .

Funciones de la Membrana Plasmática

Los constituyentes de la membrana plasmática del protozoario juegan un importante papel en la interacción entre el parásito y el hospedero. Se han identificado varios componentes de la membrana

que intervienen como factores de virulencia o interactúan en una capacidad inmunodulatoria (respuesta inmunológica, regulación alta o baja) en el hospedero. Las proteínas de Entamoeba histolytica de cepas aisladas clínicamente desempeñan un potencial útil de diagnóstico a través de ensayos serológicos utilizando suero de paciente contra las proteínas o en detección de antígenos empleando anticuerpos (20).

Los trofozoitos cultivados in vitro se caracterizan por presentar un alto nivel de pinocitosis y pocos sistemas de transportes de solutos. Estas funciones son llevadas a cabo por la membrana que se internaliza y externaliza continuamente; el recambio se lleva a cabo aproximadamente cada 20 minutos (34). La membrana plasmática se invagina formando vesículas pinocíticas que se fusionan con los lisosomas primarios. En un momento dado una fracción de la membrana plasmática del trofozoito se encuentra asociada con vesículas internas. La adición de anticuerpos contra determinantes de superficie de los trofozoitos provoca una inmovilización transitoria de la amiba (35). Al poner amibas en presencia de lectinas o anticuerpos se produce una redistribución de la membrana y se forman parches seguidos de casquetes principalmente en la región del uroide. Estos complejos de anticuerpos pueden ser secretados al medio o internalizados. A diferencia de otras células eucariotes, la amiba no pierde por completo los determinantes antígenicos. El encasquetamiento se puede presentar muchas veces sin un cambio significativo en la respuesta inmune (36).

Patogenicidad y Virulencia

Entamoeba histolytica, es un protozooario citolítico que generalmente se localiza en el humano como comensal de la luz del intestino grueso (amibiasis luminal), sin embargo, bajo ciertas condiciones puede invadir la mucosa intestinal y provocar disentería amibiana o aun más causar amibiasis invasiva en el hígado (mas frecuente), también puede afectar a otros órganos como epidermis, pulmon, bazo, cerebro, etc (38).

Numerosas evidencias indican que Entamoeba histolytica es el protozooario que parasita al hombre, comprendiendo dos formas genéticas distintas (39-41). La forma comunemente designada como no patógena la cual habita como comensal la cavidad inferior del intestino y la forma patógena que puede penetrar la mucosa y causar la enfermedad conocida como amibiasis invasiva causando destrucción masiva en las células del hospedero. Las proteínas que posee E. histolytica son consideradas especiales para la patogenicidad (42).

La reacción citolítica de E. histolytica se atribuye a la molécula formadora de poro (ameboporo) (43,44); esta molécula esta consti-

tuida por péptidos que presentan dos α - hélices anfipáticas , característica que se considera crucial para la función formadora de poro (45).

Enfermedades con manifestación invasiva como colitis amibiana o absceso hepático son la causa de 40 000 a 110 000 muertes por año a nivel mundial (46).

El estudio y comprensión de la amibiasis, se puede abordar desde varias perspectivas, en un principio la investigación se orientó hacia su tratamiento, posteriormente hacia la morfología y fisiología amibiana, así como a las reacciones inmunológicas del hospedero, la epidemiología y experimentación en animales, a fin de obtener una mejor comprensión del parásito y lograr medidas inmuno-profilácticas que resulten eficaces para combatirla.

La patogénesis de la amibiasis incluye varios eventos como son:

- Colonización del intestino por una cepa amibiana virulenta.
- Contacto íntimo con adherencia a la mucosa intestinal.
- Destrucción de las barreras intestinales por enzimas o productos tóxicos.
- Lisis de las células intestinales y de las células inflamatorias del hospedero, lo cual lleva a desarrollar, úlceras del colon, y una posterior invasión de órganos más distantes, principalmente del hígado.

Clinicamente la amibiasis puede ser: Asintomática o Sintomática (47).

Amibiasis Asintomática

La amibiasis asintomática, está presente cuando el protozoario *Entamoeba histolytica* se encuentra alojado en el hospedero, pero este último no presenta ninguna manifestación clínica, sin embargo, es fuente de infección al liberar en sus heces el quiste, la forma infectiva del protozoario que puede infectar por vía oral a nuevos individuos.

Amibiasis Sintomática

A) Amibiasis intestinal:
Que puede ser:

- a.- Disenteria amibiana aguda.
- b.- Colitis no disentérica. Disenteria amibiana crónica.

- c.- Ameboma: Forma localizada de amibiasis intestinal.
- d.- Apendicitis amibiana.

B) Amibiasis extraintestinal:

- e.- Hepática: la forma más común de amibiasis extraintestinal.
- f.- Cutánea.
- g.- En otros órganos como pulmones, bazo, cerebro, etc.

La amibiasis intestinal en el aspecto clínico varía desde el estado del portador, hasta una disenteria fulminante. Dentro de las complicaciones extraintestinales, la más común es el absceso hepático, el cual constituye todavía un problema de salud pública en nuestro país. Entamoeba histolytica es un protozoario patógeno con una distribución mundial que causa 10⁶ casos de enfermedad invasiva y al menos 100 000 mueren anualmente (48). Los mecanismos de la patogénesis de esta infección aún no están claros. E. histolytica es capaz de hacer nula la presencia de los anticuerpos casquetizándolos o bien esparciéndolos (49).

Las enzimas proteolíticas o proteasas, hidrolizan proteínas o péptidos. Estas se han clasificado en dos grandes grupos que son las proteinasas o endopeptidasas y exopeptidasas. Hasta la fecha sólo se han estudiado endopeptidasas en Entamoeba histolytica. Quizá la falta de estudio de exopeptidasas se deba a que se piensa que el ataque hidrolítico inicial sobre una proteína lo realizan endopeptidasas y las exopeptidasas sólo terminan la digestión de los péptidos que producen las primeras. Sin embargo, se ha propuesto que debe poseer varias enzimas con actividad de exopeptidasa (que inclusive pudieran ser también endopeptidasas, ya que se han descrito enzimas con ambos tipos de actividad) cuyas características y propiedades no se han estudiado.

Los grupos de Lushbaugh en los Estados Unidos (50) y Bos en Holanda (51) fueron los iniciadores del estudio de las propiedades citopáticas y citotóxicas de extractos de amibas. Entre 1978 y 1981 establecieron que las principales toxinas tenían masas moleculares entre 25 y 45 kD, que podían ser glucoproteínas, que eran inactivadas por el inhibidor de tripsina de frijol de soja, que su actividad dependía de grupos sulfhidrilo y que eran inhibibles por los inhibidores de proteinasas séricos antiproteasa α -1 y macroglobulina α -2, así como por suero normal y suero inmune. El hecho de que algunos inhibidores de proteinasas bloquearan el efecto citotóxico de los extractos amibianos estableció una correlación entre esos estudios y el de las enzimas proteolíticas.

En 1985 Avila y colaboradores demostraron claramente en extractos de Entamoeba histolytica y Entamoeba invadens que el 2-mercaptoeta

nol incrementa la actividad proteolítica y que, incluso, revierte la acción inhibitoria de agentes que bloquean grupos sulfhidrilo. En estos estudios se logró inhibir totalmente la actividad proteolítica con reactivos, que activan o bloquean grupos sulfhidrilo por lo que se concluyó que las principales enzimas proteolíticas de estas dos especies son de la clase catalítica de la cisteína. Lo anterior se confirmó con estudios posteriores que reportan que los inhibidores de proteinasas de cisteína y serina bloqueaban dicha actividad los primeros en un grado de 80 y 90% y los segundos entre 15 y 18% de la misma (52). Los resultados de estos estudios confirmaron que en Entamoeba histolytica predominan las proteinasas de la clase catalítica de la cisteína, propiedad que se ha observado en gran número de protozoarios parásitos. Las proteinasas de la clase de cisteína que posee E. histolytica son consideradas importantes en la destrucción de tejidos humanos por el parásito (53).

Se ha determinado que las proteinasas de cisteína de Entamoeba histolytica con actividad sobre globulina y caseína presentan una actividad proteolítica mayor en cepas virulentas que en las no virulentas (54).

Una de las proteinasas más estudiadas es la amebapaina cuyas propiedades se pueden resumir: 1) que digiere a los sustratos naturales en forma parecida en unos casos a la cathepsina L y en otros casos a la cathepsina B, 2) que digiere preferentemente secuencias del tipo Arg-Gli-Pen (Leu)- en el enlace entre Gli y Pen o Leu y que requiere de la Arg en la posición P2 (posición del segundo aminoácido hacia el extremo aminoterminal respecto al enlace peptídico que hidroliza la enzima), 3) que es capaz de digerir a las tres principales proteínas del tejido conectivo (laminina y fibronectina, colágena tipo I bovina nativa y a la cadena alfa-2 de colágena humana) 4) y que está localizada en la membrana plasmática en la superficie celular y en las membranas de vesículas intracelulares (55). La proteinasa amebapaina de peso molecular de 21 kD es muy parecida a la histolisina de peso molecular de 27 kD (Tannich y colaboradores reportan un 84% de homología entre ambas), esta última es capaz de degradar azocaseína, azocol, polvo azul de cuero o Hide power azure, elastina, proteoglicano nasal bovino y colágena de membrana basal y glomerular. Sin embargo no digiere colágena tipo I nativa (56). Por otra parte se ha demostrado por varios grupos y por diversos métodos que Entamoeba histolytica posee enzimas en la membrana plasmática y en membrana de vesículas internas, además de poseer proteinasas en fracciones subcelulares solubles (57). Así todavía existe variación en los resultados respecto al número y peso molecular de las enzimas que se encuentran asociadas a la membrana (58). Como la ameba requiere adherirse al tejido que va a invadir es muy probable

que las proteinasas de la membrana plasmática sean importantes para destruir el tejido del hospedero. Las proteinasas de la clase de cisteína de Entamoeba histolytica no son las únicas a las que se les ha atribuido la capacidad de destruir tejidos del hospedero, ya que se ha descrito una actividad de colagenasa parecida a una colagenasa de mamífero (que es una metaloproteinasa). Además en trabajos subsecuentes se han presentado evidencias de que esta proteinasa pudiera ser un factor determinante en la patogenicidad de la amiba (59).

La incidencia de la amibiasis muestra que solo el 10% de los individuos infectados desarrolla la enfermedad, lo que ha llevado al cuestionamiento sobre si las amibas comensales y las invasivas son de poblaciones diferentes o si el paso de un estado a otro es provocado por condiciones en el huésped. Existe evidencia que sugiere que los trofozoitos comensales difieren en los patrones de movilidad electroforética de sus isoenzimas (zimodemos) de aquellos aislados de casos sintomáticos de amibiasis (60-64). No se han aislado amibas de un solo individuo con los dos zimodemos y está reportado que existen diferencias en el reconocimiento por anticuerpos monoclonales y sondas de ADN entre amibas patogénicas y no patogénicas (39,40,65,66). Sin embargo se logró producir una respuesta virulenta con amibas de zimodemo no patogénico en un modelo animal (67). Hasta la fecha, las amibas comensales sólo pueden ser cultivadas en medios suplementados con bacterias y la axenización únicamente se ha logrado a partir de aislados con zimodemo patogénico.

Mirelman postuló que las condiciones de cultivo son un factor muy importante en la expresión de un tipo u otro de zimodemo. Su grupo reportó el cambio de comportamiento de un cultivo de amibas, que inicialmente tenían un zimodemo patogénico, a uno no patogénico por un cambio en las bacterias asociadas al cultivo (68). Estas modificaciones en las condiciones del medio pueden cambiar el metabolismo asociado a la expresión de las isoenzimas, este grupo piensa que la causa no es la contaminación por trofozoitos patogénicos, en el cultivo ya que los experimentos se realizaron con una clona no patogénica. De acuerdo a sus resultados ellos concluyen que el comportamiento patogénico o no patogénico determinado por los patrones electroforéticos de las isoenzimas, no es una propiedad estable o inherente de los trofozoitos aislados, lo que hablaría de una población que se transforma más por las condiciones microambientales, que por poblaciones diferentes. La virulencia de los trofozoitos varía considerablemente, lo que complica aun más el problema del porque unas amibas son comensales y otras virulentas: es por esto que los modelos in vitro deben

realizarse con amibas de virulencia equivalente a la de trofozoitos aislados de pacientes.

La virulencia, se ha estudiado principalmente con cultivos de zimodemo patógeno en medio axénico de Diamond (2) y se ha determinado de acuerdo a las características que presentan estas amibas:

Las amibas virulentas son capaces de:

- 1) Inducir muerte por contacto en las células del hospedero (34) causando cambios morfológicos en las células blanco. El contacto con estas células que está mediado por lectinas, produce un influjo de calcio hacia la amiba y se cree que éste provoca la liberación del ameboporo y proteasas (69).
- 2) Inducir la formación de abscesos en el hígado de hamsters o gerbilos e incrementar su virulencia por el número de veces que las amibas sean pasadas por el hígado de ambas especies.
- 3) Producir proteasas de cisteína con un posible papel en la invasión de tejidos por la degradación de colágena y laminina (70-71).
- 4) Resistir las defensas del hospedero proporcionadas por anticuerpos humorales así como por el complemento (72).

La virulencia de las amibas puede incrementarse con otros factores como exposición a colesterol (73), esteroides (74), bacterias (75), disminución de los niveles de complemento del hospedero por el factor del veneno de cobra (76) e inmunosupresión (77). La virulencia de un aislado depende de las condiciones intrínsecas de los trofozoitos, las condiciones de cultivo, y las pruebas empleadas para evaluar la patogenicidad in vivo o in vitro.

Patogenicidad: Proteínas involucradas.

Se acepta de forma general que componentes hidrolíticos y citolíticos de la amiba están involucrados en los mecanismos de patogenicidad, se ha identificado actividad litica en dos proteínas de membrana de 23.5 kD y 25 kD capaces de lisar eritrocitos de rata. La actividad hemolítica fue sensible a la temperatura y resistente a la reducción con 2-mercaptoetanol. El análisis de los aminoácidos de las proteínas puras mostró un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos: 36% para la proteína de 23.5kD y 50 % para la de 25 kD. Esta actividad litica puede estar relacionada conjuntamente con otros factores de la amibiasis en el tejido enfermo (78).

Rigotherier y colaboradores en 1992 reportaron dos proteínas de 112 kD y 72 kD con propiedades proteolíticas. El análisis de las proteínas muestra que la proteína de 112 kD es el resultado de una adhesión de dos polipeptidos uno de 50-56 kD y otro de 70-72 kD, además se encontró que la actividad proteolítica está impuesta por los polipeptidos de 112 kD y de 72 kD no así por el péptido de 50-56 kD.

En aislados de Entamoeba histolytica de patogenicidad clínica se han identificado proteínas de membrana de 29 kD (79). En 1990 De la Cruz Herrera y colaboradores encontraron que la proteína de 112 kD está involucrada directamente en los procesos de interacción inicial entre E. histolytica y el hospedero (80).

Las proteasas de cisteína de Entamoeba histolytica patogénica son consideradas importantes para la destrucción del tejido humano por el parásito (53).

Una proteína con propiedades de lectina de 220 kD de peso molecular aislada de E. histolytica de la cepa HMI:IMSS, contiene en peso 9 % de carbohidratos, es rica en residuos hidrofóbicos y muy inmunogénica en ratones, hamsters y conejos. La proteína unida y arreglada en monocapa de células MDCK inhibe el ataque de trofozoitos en el cultivo celular. Esta proteína de 220 kD aglutina eritrocitos humanos y es inhibida por concentraciones micromolares de ácido hialurónico, quitina, productos derivados de la quitina (quitinasa) y anticuerpos de la proteína purificada. Dicha proteína es reconocida por un anticuerpo de la membrana. Encina y colaboradores sugieren que esta proteína con propiedades de lectina al ser un componente de la membrana plasmática puede ser un receptor significativo involucrada en la célula y/o en la matriz de ataque. Las cepas virulentas contienen al menos dos lectinas en su superficie, una se presenta como proteína de membrana y la otra está ligada a la membrana (81).

Mecanismos inmunes contra Entamoeba histolytica

Los mecanismos de inmunidad contra el protozoario Entamoeba histolytica aun no se han establecido totalmente. En la mayoría de los individuos infectados habita como comensal y las condiciones que lo llevan al desarrollo de la enfermedad son multifactoriales y en general están relacionadas con el balance entre los mecanismos patógenos del parásito y los mecanismos de defensa del hospedero ya sean éstos inmunes o no.

Entamoeba histolytica es capaz de inducir una respuesta inmune tanto de tipo humoral, celular y de complemento en el humano; sin

embargo, no se ha establecido cual de estos mecanismos inmunes es responsable de limitar la invasión amibiana o de proveer inmunidad en contra de la enfermedad invasiva recurrente.

Entamoeba histolytica provoca una alta respuesta inmune humoral en hospederos humano y animales. Está bien fundamentado que las amibas pueden sobrevivir en la presencia de títulos altos de anticuerpos y que la reinfección es frecuente al pasar de los elevados títulos de anticuerpos (82).

La respuesta inmune humoral se desarrolla con la enfermedad invasiva, (83,84) así lo demuestran estudios seroepidemiológicos en donde del 81-100% de los pacientes con amibiasis intestinal o absceso hepático amibiano desarrollan anticuerpos IgG circulantes específicos contra E. histolytica. En otros estudios se ha demostrado la presencia de coproanticuerpos de la clase IgA en pacientes con amibiasis intestinal (85). La respuesta serológica positiva es una indicación de la invasión por el parásito, ya sea presente o pasada, aunque regularmente, los títulos más altos se presentan conforme es reciente la enfermedad invasiva (86, 87). La presencia de los anticuerpos producidos pueden durar desde 9 a 11 años, no hay evidencias que indiquen que el título de los anticuerpos correlacione con el estado clínico del paciente (83,86).

En hamster se ha encontrado que la protección conferida por inmunización con diferentes preparaciones de antígenos amibianos no correlacionan positivamente con la respuesta de anticuerpos séricos (88). A la vez se ha demostrado por estudios in vitro, que los trofozoitos amibianos son capaces de agregar, ingerir y "desprender", anticuerpos humanos anti-amibianos unidos específicamente a su superficie, estos estudios sugirieron que el parásito puede escapar de las defensas humorales del humano, pues al parecer la respuesta de anticuerpos que se genera de manera regular en la amibiasis invasiva no parece ser efectiva para controlar y proteger de la enfermedad y que la presencia de anticuerpos séricos son solo un indicador de la infección invasiva por Entamoeba histolytica (36-37).

La respuesta inmune humoral dirigida contra E. histolytica no parece ser la responsable de limitar el desarrollo de una infección ya establecida o proveer resistencia hacia la amibiasis invasiva, pero los mecanismos humorales deben ser directamente importantes en la inmunidad en contra de las cepas sensibles al complemento e indirectamente importante en el reclutamiento de las células inflamatorias como las polimorfonucleares.

Neutrófilos polimorfonucleares.

Se ha descrito que después de que los neutrófilos polimorfonucleares sufren cambios morfológicos son fagocitados por trofozoitos de

Entamoeba histolytica in vitro, posteriormente se ha demostrado que las cepas virulentas son capaces de matar a neutrófilos humanos a través de un mecanismo contacto-dependiente, mientras que los neutrófilos solo son capaces de matar a amibas axénicas de poca virulencia por medio de un proceso extracelular contacto-dependiente que actúa de manera independiente de la presencia de anticuerpos anti-amibianos.

Las amibas al causar la lisis de los neutrófilos pueden provocar la liberación de enzimas tóxicas de los mismos neutrófilos, que a su vez podría contribuir a la necrosis de los tejidos observada en la amibiasis invasora, particularmente en el absceso hepático amibiano (89).

La detección de anticuerpos específicos es muy útil en la diagnosis de la enfermedad invasiva (79).

Respuesta inmune celular.

La importancia que tienen los mecanismos inmunes celulares en la amibiasis se ha puesto de manifiesto mediante estudios tanto clínicos como experimentales.

Cuando los macrófagos interactúan con una estimulación apropiada de lipopolisacáridos amibianos, citocinas, u otros responden generando moléculas de oxígeno reducido como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) similar al estallido respiratorio. Se piensa que estos derivados metabólicos son componentes importantes en mecanismos bacteriostáticos, tumorales y microbicidas y en la patogénesis de la enfermedad provocada por Entamoeba histolytica (cepa HM1-IMSS), no obstante su inadvertida liberación en los tejidos puede contribuir en la respuesta inflamatoria potencial y asociarse al tejido enfermo (23).

Se han realizado estudios que involucran metabolitos de oxígeno como O_2 y H_2O_2 producidos por la actividad de macrófagos, como moléculas que participan en la muerte intracelular y extracelular de los parásitos, y en la patogénesis de enfermedad por parásitos (90).

Recientemente se ha demostrado que los agentes citotóxicos de Entamoeba histolytica son mediados por productos de la oxidación de nitrógeno derivado de L-arginina y que el O_2 y el H_2O_2 pueden ser cofactores y no moléculas efectoras.

Por otro lado, se encontró que los macrófagos de sangre periférica, células de bazo, y células mononucleares peritoneales de hámster previamente inmunizados eran capaces in vitro de matar a trofozoitos.

Al parecer en la amibiasis clínica y experimental los macrófagos juegan un papel importante en la patogénesis y el control de la amibiasis invasiva.

COMPLEMENTO

Para una gran variedad de organismos patógenos principalmente para aquellos que son susceptibles, la importancia de complemento en la resistencia a infecciones esta bien establecida. Esto se ha demostrado para infecciones por bacterias (92). Considerables evidencias muestran que el sistema de complemento está también involucrado a la resistencia a protozoarios (93,94) y a infecciones por helmintos (93,95). La lisis y muerte puede darse por la vía alterna.

La resistencia a lisis mediada por complemento es una propiedad inherente de algunas cepas patógenas de Entamoeba histolytica (72).

No se ha comprobado la formación de complejos inmunes en la amibiasis, además en la amibiasis los niveles de complemento están elevados y no disminuidos como se esperaría en una enfermedad por complejos inmunes. Contrario a lo anterior, se encontraron títulos de complemento bajos en pacientes con absceso hepático amibiano así como la presencia de antígenos amibianos y de anticuerpos, lo que apoya la presencia de complejos inmunes que con la presencia de neutrófilos pueden contribuir al proceso necrótico y a la patogénesis de la enfermedad.

Se ha observado una actividad amebicida hacia los trofozoitos a través de la activación de la vía alterna del complemento (96-98). En algunos pacientes con absceso hepático amibiano se demostró un decremento en los niveles normales de C3 y C1, lo que sugiere la activación de la vía alterna del complemento. Diversos estudios proponen que la resistencia de células patógenas a lisis mediada por complemento, pudiese ser la causa de la sobrevivencia amibiana *in vivo*. Sin embargo el papel del complemento en prevenir la invasión inicial de la mucosa del colon es incierto ya que el complemento libre está casi ausente de las secreciones de la mucosa intestinal donde la amiba reside (99).

La interacción entre las amibas y las células es tan compleja, ya que las amibas en sí, son potentes "células efectoras", debido a sus mecanismos citolíticos, fagocíticos y de adherencia.

Reacciones Cruzadas.

La especificidad de la reacción inmunológica esta ligada a la complementariedad entre antígeno y anticuerpo. La mayoría de los antígenos naturales son macromoléculas que presentan varios

determinantes antigénicos (distintos o idénticos) por cada molécula de ahí que se de una gran complejidad en el análisis de los antígenos, y la posibilidad de reacciones cruzadas de algunos anticuerpos con moléculas que posean determinantes antigénicos idénticos o similares.

Se ha estudiado la participación de azúcares en la respuesta inmune de las bacterias, así diversos estudios de polisacáridos en las salmonelas comprobaron que dos polisacáridos con cadenas laterales de glucosa idénticas, pero no fijas sobre los mismos carbonos de galactosa, no provocaban, reacción cruzada; estudios como éste dieron respuesta a por qué anticuerpos de conejos podían adaptarse a disacáridos pero no a monosacáridos de Escheriquia coli. También fué posible explicar por qué apenas dos azúcares se unen, puede observarse una reacción cruzada.

Se sabe que muchos antígenos microbianos dan lugar a reacciones cruzadas con eritrocitos de carnero (100).

Estudio de antígenos de superficie

Para la respuesta inmune tanto clínica como experimental las moléculas superficiales de los trofozoitos de Entamoeba histolytica deben ser los primeros antígenos reconocidos por el sistema inmune del hospedero durante la infección amibiana, además de inducir los mecanismos efectores letales para el parásito.

Uno de los aspectos de mayor importancia en el estudio de la amibiasis ha sido la caracterización antigénica de Entamoeba histolytica, para lograrlo se han empleado tanto suero de pacientes como de animales sensibilizados, bien sea con extractos homogeneizados parcialmente purificados, o bien con los trofozoitos mismos cultivados axénicamente. En un principio se tenía heterogeneidad de los aislados antigénicos debido a la metodología empleada, más el avance en la tecnología ha permitido que se aislen antígenos de superficie específicamente.

El método propuesto por Aley (1980), sobre aislamiento de membranas de E. histolytica orientó la investigación referente al aislamiento y la caracterización química e inmunológica tanto de los antígenos de superficie, como antígenos y organelos membranosos y otras moléculas citoplasmáticas, lo cual conduce a su purificación y a la posibilidad de experimentar en la inducción de inmunidad protectora.

La existencia e importancia de los antígenos de superficie ha sido demostrada por pruebas como: la inmovilización del trofozoito por suero inmune (101-103), por la unión del suero inmunofluoresceinado al trofozoito intacto (37,104,105), por lisis de los trofozoitos

mediada por anticuerpos y complemento (95, 105, 106) y por inmunoprecipitación de metabolitos. Se han identificado alrededor de 18 antígenos de superficie por análisis de membrana en Entamoeba histolytica. Sin embargo una completa caracterización bioquímica y una localización concreta de los antígenos de superficie constituyen un parámetro importante para la selección potencial de vacunas así como para comprender la bioquímica de E. histolytica en la patogénesis de la enfermedad (20).

Los antígenos amibianos más usados han sido células completas y sus homogenizados, así como fracciones solubles o particuladas obtenidas a partir de los trofozoítos. La mayoría de los estudios efectuados están relacionados con antígenos capaces de inducir la respuesta inmune humoral y muy pocos se relacionan con antígenos que sean capaces de provocar una respuesta inmune celular. La falta de antígenos puros ha limitado la correcta interpretación de pruebas para evaluar la respuesta inmune así como la interpretación de estudios epimedológicos (48).

Actualmente el empleo de anticuerpos monoclonales a facilitado la identificación y purificación de los antígenos de superficie. Los antígenos de superficie tienen la capacidad de unirse a la lectina concanavalina A, específica para unirse con glucosa o manosa, lo que indica que su composición es carbohidratada o bien son moléculas complejas con carbohidratos en su estructura. Agundis y colaboradores (108) obtuvieron anticuerpos monoclonales contra una glucoproteína de membrana de 30-35 kD de peso molecular de Entamoeba histolytica reportando siete hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra la glucoproteína mencionada y que tres de estos anticuerpos monoclonales reconocieron también a la lipopeptidofosfoglicano. Además encontraron que algunos anticuerpos monoclonales reconocieron como epítopo la porción polisacáridica, por lo que infirieron que están dirigidos contra la superficie y por ende son candidatos para su uso diagnóstico. Todos los anticuerpos monoclonales fueron de la clase IgM. Se ha encontrado que la glucoproteína de membrana de 30-35 kD es un buen inmunógeno ya que sueros de paciente con Absceso Hepático Amibiano la reconocen de manera importante entre glucoproteínas de la membrana (109).

La participación de estos antígenos polisacáridicos ha sido bien documentada no así su composición.

En 1982 Isibasi y colaboradores extrajeron un antígeno de superficie rico en polisacárido de trofozoítos de Entamoeba histolytica, cepa HK-9. Posteriormente el mismo grupo (1986) aisló y caracterizó por métodos inmunoquímicos dichas moléculas polisacarídicas, que debido a su composición fue llamada Lipopeptidofosfoliglicano (LPPG) (18,110,111).

JUSTIFICACIÓN

Durante las últimas tres décadas se ha generado una importante información referente a los antígenos de superficie de Entamoeba histolytica que se encuentran y correlacionan con la patogénesis ambiental. Al menos se han identificado 18 antígenos de superficie. Sin embargo estudios sobre las propiedades bioquímicas e inmunológicas de antígenos son poco frecuentes con la excepción de la unión entre la lectina N- acetilgalactosamina y un antígeno de alto peso molecular con actividad parecida a la de una lectina (20).

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra componentes de membrana plasmática de Entamoeba histolytica han permitido establecer diferenciación entre los antígenos en forma más específica.

Todos estos aspectos constituyen un parámetro importante para la selección potencial de vacunas así como para entender la bioquímica de Entamoeba histolytica en la patogénesis de la enfermedad.

Por lo anterior, nos resulta interesante investigar la participación de las fracciones carbohidratadas presentes en Lipopeptidofoglicano (LPPG) y una glucoproteína de membrana (GM) de aproximadamente 30-35 kD de peso molecular de Entamoeba histolytica en la respuesta inmune en humanos y en diferentes modelos experimentales, como ratón y conejo.

PLANTEAMIENTO

DEL

PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- 1.- ¿ Las fracciones carbohidratadas participarán significativamente en la respuesta inmune contra los antígenos de superficie GM y LPFG de Entamoeba histolytica ?
- 2.- ¿ Los anticuerpos monoclonales son capaces de reconocer a las fracciones carbohidratadas tanto de GM como de LPFG ?
- 3.- ¿ Presentarán carbohidratos similares la GM y la LPFG ?

HIPOTESIS

- 1.- Los sueros de paciente con absceso hepático amibiano serán capaces de reconocer la GM y la LPFG.
- 2.- Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las fracciones carbohidratadas de GM presentarán reactividad cruzada con la LPFG .
- 3.- La reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales estará dada por la similitud de los azúcares en la GM y la LPFG.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de azúcares en la reacción cruzada entre dos moléculas de membrana de Entamoeba histolytica

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar por Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) la reacción cruzada entre dos moléculas de membrana de Entamoeba histolytica, empleando:
 - i) Sueros de paciente con absceso hepático amibiano.
 - ii) Sueros de conejo inmunizados con GM.
 - iii) Sueros de ratón inmunizados con GM.
 - iv) Sobrenadantes de anticuerpos monoclonales contra GM.
- 2.- Identificar por microscopía electrónica el antígeno de superficie empleando anticuerpos monoclonales.
- 3.- Evaluar el grado de participación de la fracción carbohidratada de los antígenos GM y LPFG en el complejo mosaico antigénico. A través de tratamiento con metaperyodato.
- 4.- Evaluar la inhibición de la reacción cruzada antígeno-anticuerpo por los azúcares presentes en LPFG por el método de ELISA.

MATERIAL

Y

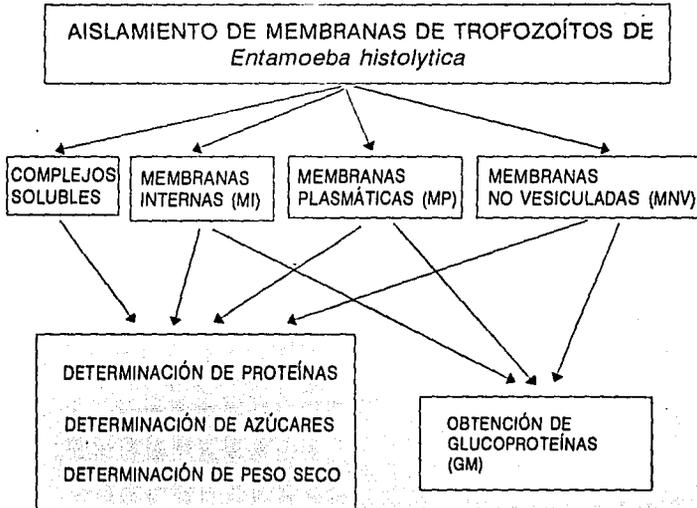
METODOS

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

LA METODOLOGÍA GENERAL SE DIVIDIÓ EN TRES FASES

FASE I

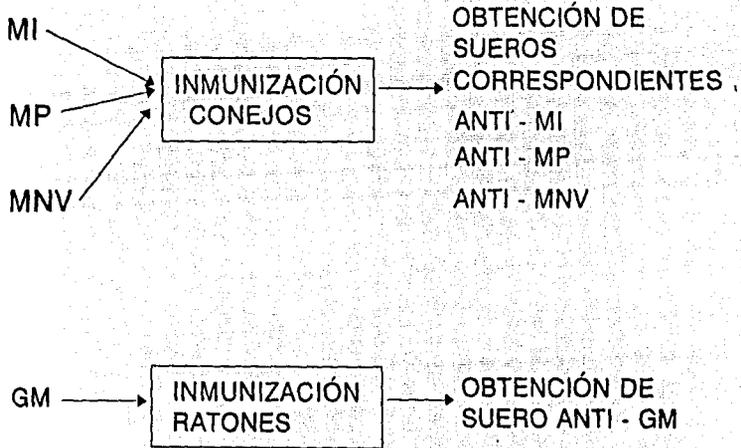
PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS Y CARACTERIZACIÓN



-IDENTIFICACION DEL ANTIGENO GM
CON EL MONOCLONAL 3G7

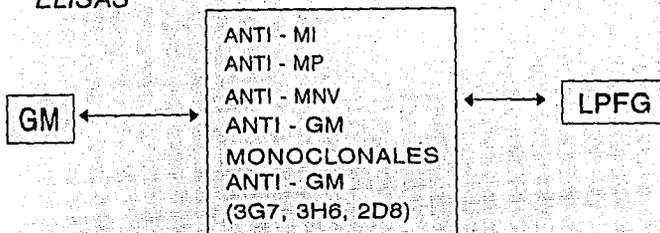
FASE II

OBTENCIÓN DE ANTISUEROS

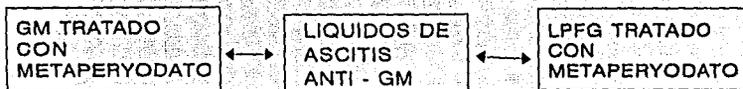


FASE III

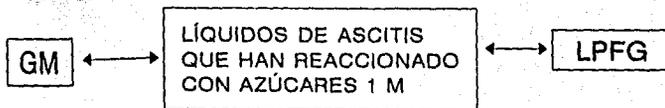
A) REACCIONES INMUNOLÓGICAS ELISAS



B) REACCIONES INMUNOLÓGICAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI - GM INHIBIDOS CON METAPERYODATO



C) REACCIÓN CRUZADA TITULACIÓN DE LÍQUIDO DE ASCITIS



AISLAMIENTO DE MEMBRANAS DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica.

Aislamiento de Membranas y Componentes Solubles del Trofozoito de Entamoeba histolytica

Aplicando la metodología de Aley y colaboradores (19) se realizó la fragmentación de los trofozoitos para obtener por separado las membranas internas, membranas no vesiculadas, membranas plasmáticas y complejos solubles. Esta técnica se basa en la unión específica de la Concanavalina A con los residuos de glucosa o manosa constituyentes de las glucoproteínas de la membrana plasmática. Tal enlace modifica la densidad de la membrana y ayuda a permitir su fragmentación durante el aislamiento. La adición posterior de alfa metil manósido o glucosa libera a las glucoproteínas de su enlace con Concanavalina A.

Reactivos

- A) Amortiguador de fosfatos salino (PBS) 0.15 M pH 7.2
- B) PBS 0.15 pH 7.2 adicionado de cloruro de magnesio 10 mM Concanavalina A
- C) Amortiguador Tris
- D) Inhibidor de proteasas
- E) Manitol 0.5 M en amortiguador tris
- F) Sacarosa 0.58 M en amortiguador tris
- G) Sacarosa 20 % en amortiguador tris
- H) Alfa metil manósido 1 M en amortiguador tris

Preparación de Soluciones

- A) Amortiguador de fosfatos salino (PBS) 0.15 mM, pH 7.2

Solubilizar en agua destilada las siguientes sales: 8.7 g de cloruro de sodio, 1.3 g de fosfato de potasio monobásico y 1.4 g de fosfato dibásico de sodio. Mezclar, ajustar a pH 7.2 y aforar a 1000 ml.

- B) PBS 0.15 M pH 7.2 adicionando cloruro de magnesio 10m Concanavalina A.

Preparar una solución de concanavalina A solubilizada en PBS-Cloruro de magnesio pH 7.2 a una concentración de 1 mg Con A/ml PBS-MgCl₂

C) Amortiguador TRIS: Tris 10 mM + fenilmetilsulfonifluoruro (PMSF) 2 mM.

Solubilizar 1.2114 g de tris (hidroximetilaminometano) en 800 ml de agua destilada. Adicionar 0.203 g de $MgCl_2$ agua destilada. Ajustar a pH 7.5 con HCl 2 N.

D) Inhibidor de Proteasas

Para solubilizar al inhibidor de proteasas adicionar a 348.4 mg de PMSF, 10 ml de alcohol isopropilico y sumergirlo en un baño de agua hirviendo. Colocar en el mismo baño la solución Tris- $MgCl_2$ y agregarle la de PMSF cuando ambas tengan temperatura similar. Dejar enfriar a temperatura ambiente y aforar a 1000 ml con agua destilada.

E) Manitol 0.5 M en amortiguador Tris

F) Sacarosa 0.58 M en amortiguador Tris

G) Sacarosa 20% en amortiguador Tris

H) Alfa metil manósido 1 M en amortiguador Tris

Procedimiento

Sin excepción cada paso del aislamiento de membranas se realiza en baño de hielo y con la centrifuga a 4 ° C

- Lavar las amibas tres veces con PBS 0.15 M pH 7.2 y dos veces con PBS- $MgCl_2$ mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. De esta forma se consigue eliminar los constituyentes del medio de cultivo.
- Resuspender el paquete ambiano en PBS- $MgCl_2$ de tal forma que la concentración sea de 4 a 6 x 10⁷ células/ml
- Determinar la viabilidad celular mediante la exclusión de colorante azul de tripán 1%
- Añadir rápidamente un volumen igual de la solución de concanavina lina A 1 mg/ml. Reposar la mezcla durante 5 minutos
- Lavar dos veces con PBS- $MgCl_2$, centrifugando a 750 rpm durante dos minutos, con el fin de eliminar el exceso de concanavalina A.

- Decantar el sobrenadante
- Resuspender el paquete celular en 12 ml de amortiguador Tris, e incubar 10 minutos en este amortiguador hipotónico, con el propósito de favorecer el hinchamiento celular. Homogeneizar con un homogeneizador de cristal Dounce de vástago delgado mediante 30 compresiones.
- Verificar por microscopía la lisis celular y la formación de capas de membrana. Tomar una alícuota como control.
- Depositar el homogeneizado sobre un gradiente de dos pasos formado por 8 ml de manitol 0.5 M sobre 4 ml de sacarosa 0.58 M.
- Centrifugar 30 minutos a 750 rpm. Separar el sobrenadante y etiquetarlo como sobrenadante I, mientras que el sedimento del fondo del tubo corresponde al precipitado I.
- Centrifugar el sobrenadante I a 24000 rpm durante 60 minutos.
- Separar el sobrenadante II, el cual contiene los complejos solubles (CS), mientras que el precipitado II está constituido por las membranas internas (MI).
- Resuspender el precipitado I en un ml de Tris- alfa metilmanósido 1 M, e incubar 40 minutos con agitación ocasional, para liberar las membranas plasmáticas de la concanavalina A.
- Disolver con tres volúmenes de amortiguador Tris y homogeneizar mediante 80 compresiones del vástago.
- Depositar el homogeneizado sobre 4 ml de sacarosa al 20% y centrifugar a 750 rpm durante 30 minutos para obtener el sobrenadante III y el precipitado III que contiene las membranas no vesiculadas (MNV) y restos celulares.
- Centrifugar el sobrenadante III a 24000 rpm por 60 minutos.
- Eliminar el sobrenadante IV y recuperar el precipitado IV constituido por las membranas plasmáticas (MP).

AISLAMIENTO DE MEMBRANAS Y COMPONENTES SOLUBLES DE Entamoeba histolytica

Lavar las amibas 5 veces

Resuspender 4 a 6×10^7 células/ml en
PBS-MgCl₂ 10mM

Incubar 5 minutos con concanavalina A 1 mg/ml

Eliminar el exceso de Con A

Favorecer el hinchamiento celular por incu-
bación en amortiguador Tris

Homogeneizar por 10 compresiones

Centrifugar 30 min a 750 rpm sobre un gradien-
te de manitol-sacarosa

sobrenadante I

Precipitado I

Centrifugar 60 min a
24000 rpm

Incubar 40 min con
alfa-metil manósido

Sobrenadante II
COMPLEJOS
SOLUBLES

pp II
MEMBRANAS
INTERNAS

Homogeneizar por 80
compresiones

(CS)

(MI)

Centrifugar 30 min a 750
rpm sobre sacarosa

Sobrenadante III

ppdo III
MEMBRANAS

Centrifugar 60 min
a 24000 rpm

NO
VESICULADAS

(MNV)

ppdo.IV
MEMBRANAS
PLASMATICAS
(MP)

OBTENCION DE GLUCOPROTEINAS.

Debido a que las proteínas de membrana son muy insolubles en sistemas acuosos neutros fue necesario emplear un amortiguador de fuerza iónica alta, a fin de extraer las proteínas glucosolubles de membrana (112,113).

Reactivos

- A) Amortiguador de rompimiento.
- B) Inhibidores de proteasas (Inhibidor al que ya se hizo referencia en el apartado anterior)

Preparación de Soluciones.

A) Amortiguador de rompimiento: Tris 50 mM + KCl 50 mM + $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 5 mM. Disolver 6.06 g de Tris, 372.8 mg de KCl y 68 mg de acetato de magnesio en 90 ml de agua destilada. pH 7.6

- B) Inhibidor de proteasas:

Procedimiento

Resuspender las fracciones membranales obtenidas por el método de Aley en 2 a 3 ml de amortiguador de rompimiento. Homogenizar y dejar en reposo toda la noche a 4 °C. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Recuperar el sobrenadante, el cual contiene los compuestos glicosolubles de la membrana. Resuspender el precipitado en un volumen igual de amortiguador de rompimiento y repetir el proceso dos veces, a fin de extraer la mayor parte de las proteínas solubles. Almacenar las muestras a -20 °C.

DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY

Es una modificación del método de Folin-Ciocalteu, basado en la determinación de triptófano y la tirosina contenidos en las proteínas, ya que en presencia de cobre son capaces de reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu formando un complejo de color azul. Sin embargo debido a que la cantidad de estos aminoácidos varía en las diferentes proteínas se requiere una curva de referencia (114).

Reactivos

- A) Proteína de referencia 1 mg/ml

- B) Reactivo B:
 * Tartrato doble de sodio y potasio
 * Sulfato de cobre
 * Carbonato de sodio 2% en hidróxido de sodio 1N
- C) Reactivo de Folin-ciocalteau

Preparación de Soluciones.

- A) Proteína de referencia 1 mg/ml.
 En este caso se utilizó como proteína estandar albúmina sérica bovina disuelta en solución salina al 0.85%.
- B) Reactivo B
 Está formado por tres soluciones que se deben mezclar hasta el momento de utilizarse, ya que el reactivo de B es funcional por poco tiempo.
 * Tartrato doble de sodio y potasio: disolver 200mg de tartrato de sodio y potasio en 10 ml de agua destilada.
 * Sulfato de cobre: Disolver 100 mg de sulfato de cobre pentahidratado en 10 ml de agua destilada.
 * Carbonato de sodio 2% en hidróxido de sodio 1N.
- Reactivo B: Se mezcla 1 ml de tartrato de sodio y de potasio con 1 ml de sulfato de cobre, añadir 100 ml de carbonato de sodio.
- C) Reactivo de Folin
 Mezclar 5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteau con 5 ml de agua destilada. Prepararlo al momento de usar.

Procedimiento.

Elaboración de la curva patrón.

Preparar los tubos de ensayo por duplicado.

No. Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
µg de Proteína	-	10	20	50	100	150	200	250
estándar (ml)	-	.01	.02	.05	.10	.15	.20	.25
NaCl 0.85% (ml)	.4	.39	.38	.35	.30	.25	.20	.15

- Añadir a cada tubo 2 ml de reactivo B. Mezclar bien. Dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar a cada tubo 0.2 ml del reactivo de Folin- Ciocalteau
- Mezclar y dejar reposar 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad.
- Medir en el espectrofotómetro con una longitud de onda 500 nm.
- Calibrar con el tubo 1 blanco.
- Construir la curva de calibración con los valores de absorción contra los μg de proteína.

Muestras problema .

Las muestras problema se tratan de igual forma que las muestras de proteína de referencia, también deben de incluirse tubos blanco. Se puede poner 0.1 ml de muestra más 0.3 ml de solución salina (0.85%) y en caso que el valor de absorción no esté comprendido dentro de la curva patrón, probar diluciones mayores o menores según se requiera.

- Determinar sobre la curva de calibración los mg de proteína presente en el tubo, en función de su absorción.
- Calcular los mg de proteína/ml con base en la cantidad de muestra que se puso inicialmente en el tubo.

DETERMINACION DE AZUCARES POR EL METODO FENOL-SULFURICO

El método colorimétrico Fenol-ácido sulfúrico permite cuantificar azúcares totales y el contenido de azúcares en glucoproteínas, debido a que la unión del reactivo con los residuos del azúcar forma un complejo de color naranja (115).

Reactivos

- A) Azúcar de referencia
- B) Fenol
- C) Acido sulfúrico

Preparación Soluciones.

- A) Azúcar de referencia 1 mg/ml
Se utilizó glucosa como azúcar de referencia.

B) Solución acuosa de fenol al 5 %

C) Acido sulfúrico concentrado.

Procedimiento.

- En tubos de ensaye, libres de detergente, se colocó por duplicado cantidades crecientes en glucosa, ajustando el volumen con agua destilada a 0.5 ml/tubo.

No. de tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
(μ g azúcar)	-	5	10	20	30	40	50	100
estándar (ml)	-	.005	.01	.02	.03	.04	.05	.10
agua (ml)	.5	.495	.49	.48	.47	.46	.45	.40

- Agregar a cada tubo 0.3 ml de fenol 5%, colocándolos en baño de hielo.
- Añadir a cada tubo 1.8 ml de ácido sulfúrico concentrado, depositando el ácido en el centro del líquido. Mezclar inmediatamente.
- Cuando los tubos estén a temperatura ambiente, medir la absorción a una longitud de onda de 480 nm
- Construir la curva de calibración graficando los valores de absorción vs mg de azúcar.
- Las muestras problema se tratan de igual forma, y el valor de absorción de éstas se interpola en la curva para determinar la cantidad de azúcares. Calcular mg de azúcar/ml con base en el volumen de muestra empleado.

DETERMINACION DE PESO SECO POR EVAPORACION

Esta técnica permite estimar la cantidad de soluto presente en una muestra en solución. Sin embargo, debido a que el agua se pierde de la solución por evaporación, la muestra se desnaturaliza por la temperatura empleada.

Reactivos.

Solución salina 0.9%

Procedimiento.

- Lavar perfectamente varios vidrios de reloj y colocarlos en una estufa a temperatura constante de 100 °C.
- Verificar diariamente el peso seco de cada vidrio de reloj, en balanza analítica, hasta obtener peso constante. Antes de pasar los vidrios de reloj se dejan enfriar dentro de una cámara desecadora .
- Previamente realizar una diálisis exhaustiva a las muestras (fracciones celulares de Entamoeba histolytica), con solución salina 0.9%.
- Colocar una alicuota de cada muestra en un vidrio de reloj y dejarla secar totalmente a 100 °C.
- Pesarse cada vidrio de reloj y obtener la diferencia respecto a su peso inicial. La diferencia corresponde al peso seco de la muestra.
- Calcular el peso seco de la muestra total extrapolando en función del volumen de la alicuota empleada.

PORCENTAJE DE CADA FRACCIÓN CELULAR DE Entamoeba histolytica

Por el método de Lowry determinar proteínas al homogenizado de la amiba y a las cuatro fracciones (CS, MI, MP y MNV) obtenidas por el método de Aley, con el fin de cuantificar el porcentaje que se obtiene de cada una a partir de un determinado número de células. Considerando como 100% la cantidad de proteína presente en el homogenizado amibiano, y con base en ello calcular el porcentaje de recuperación de proteína. Realizar cuatro veces con diferentes lotes de amibas y obtener el promedio. Así mismo, emplear un lote de 150 X 10⁶ amibas para determinar el porcentaje de peso seco de las fracciones celulares.

Además con la cuantificación de azúcares por el método Fenol-ácido sulfúrico se calcular la relación proteína/ carbohidrato.

OBTENCION DE LIPOPEPTIDOFOSFOGLICANO (LPPG)

Procedimiento.

Extracción de la fracción polisacáridica por el método de fenol-agua descrito por Westphal-Jann en 1965. (modificado por Isibasi y col., 1986)

La Lipopeptidofosfoglicano fue proporcionada por la Dra. Cruz M.S.

REACCIONES INMUNOLOGICAS

Material biológico

- Conejos Nueva Zelanda (NZ)
- Ratonas hembras cepa Balb/c
- Antígeno GM, MI, MP, y MNV
- Sueros de paciente con absceso hepático amibiano

Reactivos

- Adyuvante de Freund
- Solución salina 0.85%

Obtención del antisuero de conejo y ratón

Con la finalidad de obtener anticuerpos específicos, se inocularon 3 conejos NZ con homogenizados de MI, MP y MNV y ratonas hembras de la cepa Balb/c con el antígeno GM.

- El antígeno GM y de MI, MP y MNV se preparó en vacunas resuspendidos en solución salina y emulsificado con adyuvante completo de Freund.

Inmunización

Inocular los conejos por vía subcutánea con una dosis de 1 mg/kg de peso.

Inmunización de ratonas hembras de la cepa Balb/c. Inmunizar por vía intraperitoneal, administrando una dosis de 1 mg/kg de peso. Ambos; conejos y ratonas se inmunizaron 4 veces en 1 mes (días 1,7,15 y 21). Ver esquema de inmunización.



1a inmunizacion
1 mg/Kg de peso con GM.

Día



Via intraperitoneal.

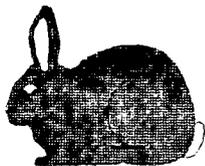


Refuerzo con
1 mg/kg de peso con GM

Dias

7, 15 y 21

ESQUEMA DE INMUNIZACION RATONES



1a Inmunización
1 mg/kg de peso con MI,
MP y MNV

(según sea el caso)

Día

1

Vía Subcutánea

Refuerzo con

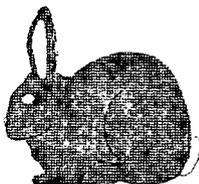
1 mg/kg de peso
de MI, MP y MNV

(según sea el caso)

Días

7, 15 y 21

ESQUEMA DE INMUNIZACION
CONEJOS



OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Procedimiento

La fusión celular se realizó siguiendo el método de Koller y Milstein (116).

El medio utilizado durante la selección y mantenimiento de los híbridos fue Medio de Eagle modificado por Dulbecco y suplementado con nutrientes (DEM al 20%).

Los anticuerpos monoclonales fueron obtenidos por QFB. C. Agundis.

OBTENCION DE LIQUIDOS DE ASCITIS

(Expansión de anticuerpos monoclonales)

Utilizar para la expansión in vivo ratones de la cepa Balb/c inyectándolos por vía intraperitoneal con 0.5 ml del cultivo de híbridos en fase logarítmica de crecimiento. Inocular los ratones previamente con adyuvante incompleto de Freund-solución salina y/o pristena.

Obtener los líquidos de ascitis por punción peritoneal dos semanas después de la inmunización.

IDENTIFICACION DEL ANTIGENO GM DE Entamoeba histolytica POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

Unir el monoclonal 3G7 a la superficie de los trofozoitos de amiba para la identificación del antígeno de superficie GM por microscopía electrónica a través de la reacción con peroxidasa.

Material

- Trofozoitos de Entamoeba histolytica
- Monoclonal 3G7
- Sobrenadantes de la línea SP2
- Conjugado α - ratón 1:100
- Conjugado α - conejo peroxidasa 1:100

Reactivos.

- Glutaraldehído al 3%
- PBS-amortiguador
- Lisina
- Tris 0.05M + H₂O₂ 0.03% en 100 ml de H₂O. pH 7.6
- B-3 diaminobencina 4-clorhaldehído

- H₂O₂ 0.03%
- Buffer de cacadilatos 0.1M pH 7.4
- Tetraóxido
- Alcohol descendente
- Resina araldita
- Microscopio Electrónico Jeal 100-S de transmisión .

Para la microscopía electrónica seguir la metodología descrita por Reynolds y Walson en 1963 (117).

Procedimiento

Realizar todos los pasos por duplicado y utilizar la mitad con conjugado α - ratón peroxidasa y la otra mitad con conjugado α - conejo peroxidasa.

- 1.- Cosechar 5X 10⁶ trofozoitos cepa HMI-IMSS, por centrifugación. Posteriormente lavar 3 veces con PBS a 2000 rpm/10 min.
- 2.- Desechar el sobrenadante y fijar la pastilla con glutaraldehído al 3% (v/v) en PBS-amortiguador durante 3 horas.
- 3.- Lavar los trofozoitos resuspendiéndolos en amortiguador PBS a 1500 rpm/3 min
- 4.- Tratar el botón con lisina 1% por 15 min
- 5.- Lavar después 3 veces con amortiguador PBS
- 6.- Colocar 0.5 ml de la suspensión de trofozoitos; permitir su sedimentación y entonces adicionar 0.5 ml del líquido de ascitis 3G7 (dil.1:5)
Control negativo: Trofozoitos más sobrenadante de la línea SP2.

Incubar 1.5 horas a 37 °C, toda la noche a 4 °C y 1 hora a 37 °C al día siguiente.
Eliminar el sobrenadante.
- 7.- Lavar dos veces con amortiguador PBS.
- 8.- Para eliminar la actividad endógena de peroxidasa adicionar tris 0.05M + H₂O₂ 0.03% en 100 ml de agua. pH 7.6 dejarlo por 10 minutos

- 9.- Lavar tres veces con tris pH 7.6
- 10.- Adicionar el conjugado c ratón peroxidasa 1:100 e incubar 30 min a 4 °C
- 11.- Lavar tres veces con tris pH 7.6
- 12.- Posteriormente incubar con 0.41 ml de B-3 diaminobencina 4 clorhidrato disuelto en tris pH 7.6
- 13.- Adicionar 3 ml de H₂O₂ al 3% e incubar por 10 min en la oscuridad
- 14.- Lavar tres veces con tris pH 7.6
- 15.- Fijar con glutaraldehído 3% en buffer de cacadilatos 0.1M pH 7.4
- 16.- Hacer la post-fijación con tetraóxido de osmio al 1 % en buffer de cacadilatos 0.1M pH 7.4.
- 17.- Incubar en alcohol con concentraciones ascendente
- 18.- Incluir en resina araldita
- 19.- Observar en el microscopio electrónico

A partir del paso 14 se conto con el apoyo del Dr. Pedro Valencia a quién se agradece su invaluable colaboración

ENSAYO INMUNOENZIMATICO EN FASE SOLIDA (ELISA)

Material y Reactivos

- Placas para ELISA de 96 pozos
- Amortiguador de carbonatos pH 9.5
- Amortiguador de citratos pH 5.6
- Peróxido de hidrógeno
- Ortofenilendiamina
- Sustrato para peroxidasa
- Acido sulfúrico 2.5 N
- Amortiguador de fosfatos 0.01M (PBS) pH 7.2
- PBS-leche al 5%
- Tween 20%

Material biológico

- Antígenos GM y LPFG ambos a una concentración de 10 mg/ml
- Conjugado de cabra anti- IgG de ratón unido a peroxidasa.
- Conjugado de cabra anti- IgG de conejo unido a peroxidasa.
- Conjugado de anti-humano policlonal peroxidasa.

Preparación de Soluciones.

Amortiguador de carbonatos.

Solubilizar en agua 7.0 g de carbonato de sodio más 2.8 g de bicarbonato de sodio. Ajustar el pH 9.5 y aforar a un volumen de 1000 ml.

Amortiguador de citratos

Solubilizar en agua 29 g de citrato de sodio más 4.1 g de ácido cítrico. Ajustar el pH a 5.6 y aforar a 1000 ml.

Sustrato para peroxidasa

En un tubo limpio solubilizar 6 mg de O-fenilendiamina en 12 ml de amortiguador de citratos pH 5.6 y adicionar 100 ml de peróxido de hidrógeno al 3%. Observar que la mezcla esté incolora.

Amortiguador de fosfatos (PBS) 0.15 M

Para obtener una solución de PBS concentrada 10X se solubilizan aproximadamente en 400 ml de agua 14.19 g de fosfato dibásico de sodio anhidro + 13.60 g de fosfato monobásico de potasio + 87 g de cloruro de sodio. Ajustar el pH a 7.2 y aforar a 1000 ml.

Procedimiento

- 1.- Colocar en cada pozo de la placa 100 μ l del antígeno (con una concentración de 50 mg/ml) en amortiguador de carbonatos. Incubar 1 hr a 37 °C y toda la noche a 4 °C
- 2.- Lavar con PBS-Tween 0.1%
- 3.- Bloquear con PBS-leche al 5% durante 1.5 horas a 37 °C
- 4.- Posteriormente lavar con PBS-tween 0.1%

5.- Colocar :

- i) Sueros de paciente con absceso hepático a una dilución de (1:100 y 1:200) y sueros de personas normales a las mismas diluciones
- ii) Sueros de conejo anti-membranas internas (MI), anti-membranas plasmáticas (MP) y anti-membranas no vesiculadas (MNV). Dil. (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, y 1:3600)
- iii) Sueros de ratón anti GM a dil. (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, y 1:1000)
- iv) Sobrenadantes de anticuerpos monoclonales contra GM según fuese el caso.

Incubar 1.5 horas a temperatura ambiente cuando la ELISA es de sueros y 1 hora a 37 °C y toda la noche a 4 °C si la ELISA es con sobrenadantes de anticuerpos monoclonales.

6.- Después de la incubación lavar con PBS-tween 0.1%

7.- Adicionar el segundo anticuerpo.

Para i, emplear conjugado de suero de cabra anti humano (dil. 1:300) en PBS-leche al 5%

En ii, emplear el conjugado de suero de cabra anti- IgG de conejo-peroxidasa (dil.1:300) en PBS-leche al 5%

Y para iii e iv, emplear conjugado de suero cabra anti IgG de ratón-peroxidasa (dil. 1:300) en PBS-leche al 5 % . Incubándose durante 1.5 horas a 37 °C

8.- Lavar exhaustivamente con PBS-Tween 0.1%

9.- Colocar el sustrato 100 µl/pozo. manteniéndolo por 15 min en la oscuridad.

10.- Parar la reacción con ácido sulfúrico 2.5 N

11.- Leer la absorción a 490 nm

Realizar esta prueba tanto con GM como con LPPG.

TRATAMIENTO CON METAPERIODATO

Material biológico

Antígenos GM y LPFG

Reactivos

2-B-metaperiodato

Someter los antígenos GM y LPFG a la acción del 2-B-metaperiodato 0.05 M durante dos horas a temperatura ambiente.

Después de este tratamiento probar por ELISA su comportamiento frente a sobrenadantes de hibridomas (células con anticuerpos monoclonales), siguiendo la metodología ya descrita.

Comparar los resultados con los obtenidos en la ELISA con el antígeno sin tratamiento.

EVALUACION DE LA REACCION CRUZADA ENTRE GM Y LPFG

Material y Reactivos

- Material y Reactivos para la prueba de ELISA ya mencionados con anterioridad.

- Azúcares:

- 1.- D (+) Galactosa
- 2.- N - acetil -D- galactosamina
- 3.- α (-) Fucosa
- 4.- Sacarosa
- 5.- α - metil -D- manosida
- 6.- α - metil -D- glucosida
- 7.- N - acetil -D- glucosamina
- 8.- 1-2 metil glucopiranosida
- 9.- Manosa
- 10.- Glucosa

Preparar los azúcares a una concentración de 1 M

Material biológico.

Líquidos de ascitis de ratón (3G7, 3H6, 2D8).

Procedimiento.

- Seleccionar la concentración ideal de reacción del antígeno-anticuerpo por ELISA. Para ello se pruban diferentes diluciones de los líquidos de ascitis, seleccionando así aquella dilución en la que se obtenga un valor de absorción próxima a 1.
- Incubar los líquidos de ascitis a la concentración óptima con el mismo volumen de los azúcares a probar en tubos Ependorf durante 4 horas a 37 °C y dos noches a 4 °C.
- El control positivo son los mismos líquidos de ascitis solo que diluidos con PBS pH 7.2
- Evaluar la inhibición de la reacción cruzada antígeno- anticuerpo por azúcares específicos de LPFG y otros azúcares efectuando la metodología de ELISA enfrentando los antígenos GM y LPFG a los líquidos de ascitis que han reaccionado con los azúcares.

R E S U L T A D O S

Aislamiento de membranas en trofozoitos de Entamoeba histolytica

La viabilidad de los cultivos de trofozoitos de Entamoeba histolytica fue mayor al 90% en el aislamiento de membranas realizado.

La tabla I muestra el porcentaje promedio de proteína de las fracciones membranales aisladas por el método de Aley, así como el porcentaje seco de las mismas. La recuperación de proteínas de las fracciones celulares fue de 90.5 a 97.8%, considerando como 100% la proteína presente en el homogeneizado total de los productos finales del aislamiento (tipos de proteínas y complejos solubles), la proteína presente en el homogeneizado fué de 1.08 a 1.2 mg de proteína total por millón de amibas.

Membrana	% de proteína	% de peso seco
Membrana Interna	14.67	28.11
Membrana Plasmática	2.61	2.42
Membrana No Vesiculada	16.79	7.18

Tabla I. Proporción de proteínas y peso seco en las membranas celulares de Entamoeba histolytica

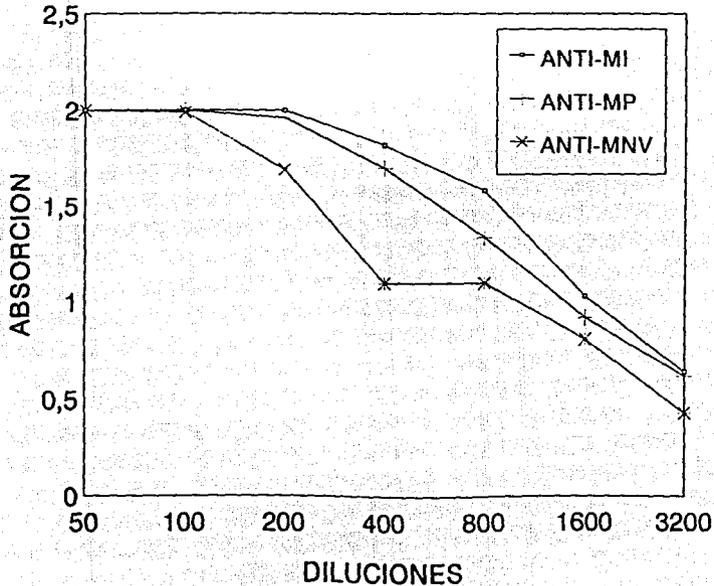
La tabla II presenta la cantidad de azúcares en las membranas celulares de Entamoeba histolytica. Obsérvese que el contenido de azúcares es mayor en membranas no vesiculadas.

Membrana	mg azúcar	mg proteína	azúcar/proteína
Membrana Interna	2.58	9.3	0.27
Membrana Plasmática	0.24	2.2	0.11
Membrana No Vesiculada	3.33	12.6	0.26

Tabla II Contenido de azúcares en las fracciones membranales de Entamoeba histolytica, en un volumen con 10×10^6 trofozoitos.

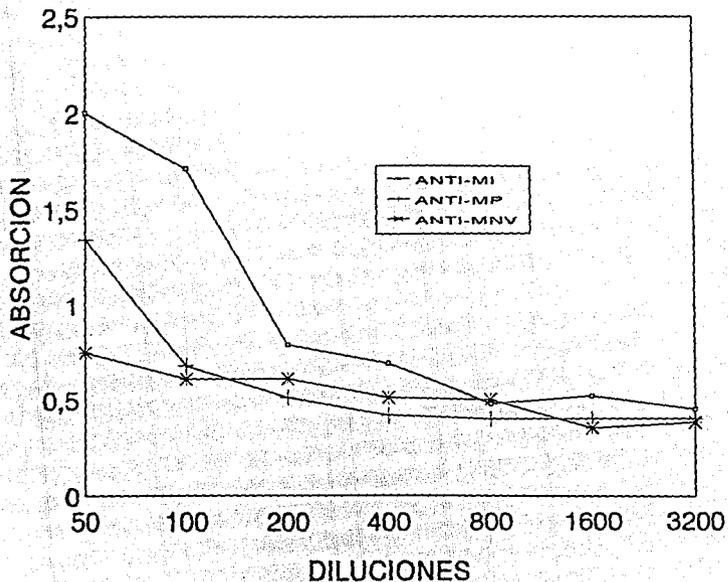
En las gráficas I y II se informan los resultados de ELISAS de conejos inmunizados con homogeneizados de Membranas Internas (MI), Membranas Plasmáticas (MP) y Membranas No Vesiculadas (MNV) frente a los antígenos GM y LPFG. Notése que los antisueros fueron más específicos a GM.

ELISA. SUERO DE CONEJO ANTIGENO GM



GRAFICA I

ELISA.SUERO DE CONEJO ANTIGENO LPFG



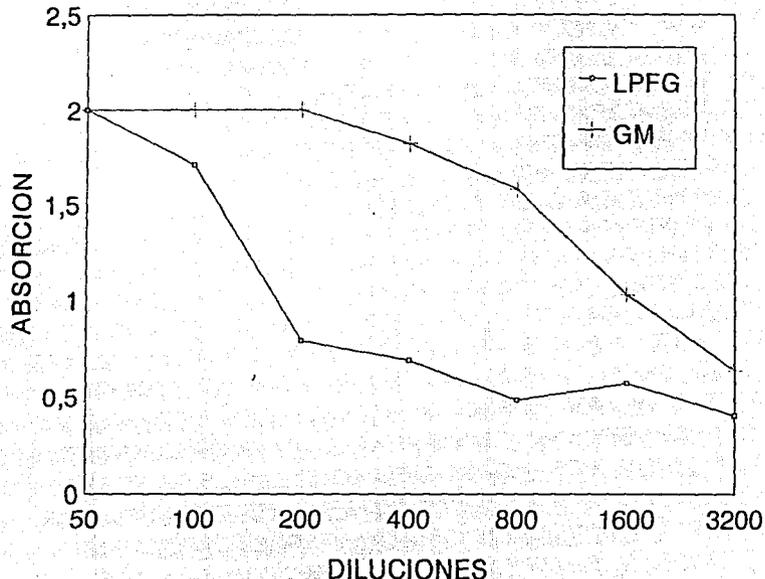
GRAFICA II

Las gráficas III, IV, y V, muestran de manera individual los valores en absorción obtenida por el método de ELISA a los anticuerpos séricos de los conejos inmunizados con MI, MP y MNV contra los antígenos GM y LPFG.

Las ELISAS del suero anti-GM de ratón (dil. 1:50 hasta 1:100) frente a los antígenos GM y LPFG dieron valores de absorción mayor a 2.

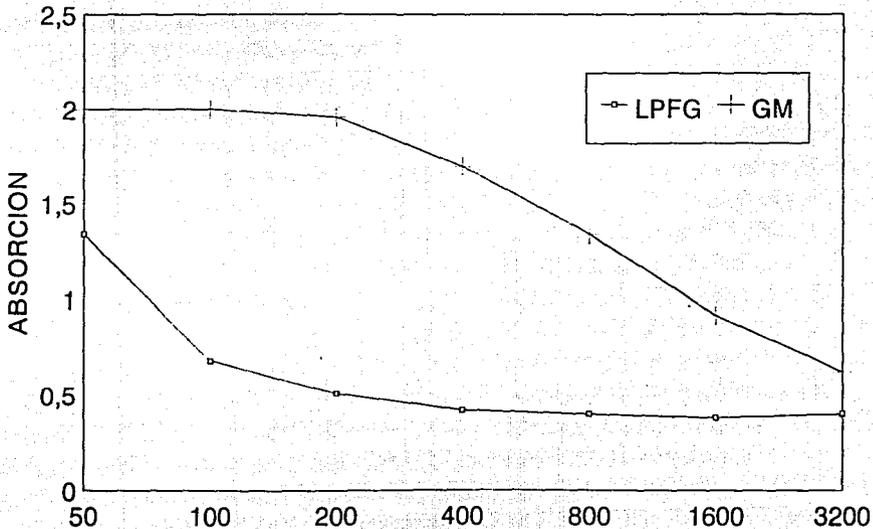
Cabe mencionar que esta prueba no se repitió debido a que el antígeno LPFG se terminó.

ELISA SUERO DE CONEJO ANTI MEMBRANAS INTERNAS



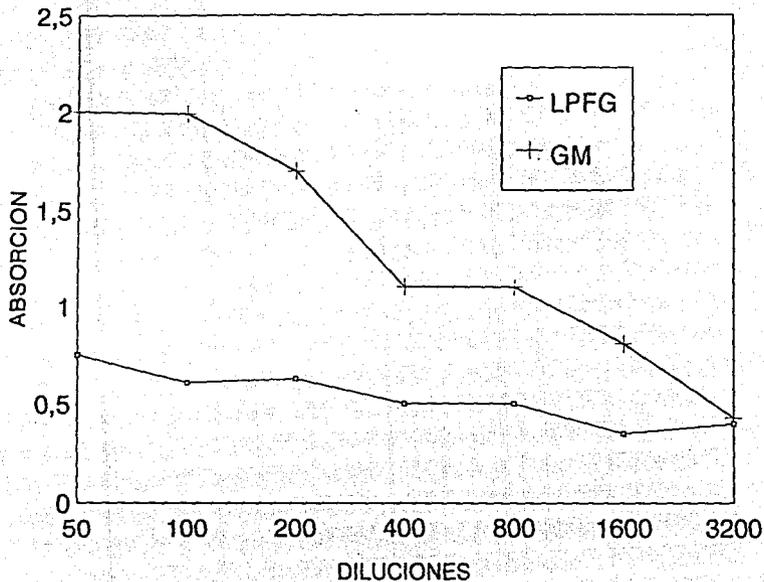
GRAFICA III

ELISA DE SUERO DE CONEJO ANTI MEMBRANAS PLASMATICAS



DILUCIONES
GRAFICA IV

ELISA DE SUERO DE CONEJO ANTI MEMBRANAS NO VESICULADAS



GRAFICA V

Los sueros de paciente reconocieron a los antígenos GM y LPFG a las diluciones probadas. El antígeno mejor reconocido fue LPFG.

La tabla III muestra estos resultados.

ELISA SUEROS DE PACIENTE CON GM Y LPFG

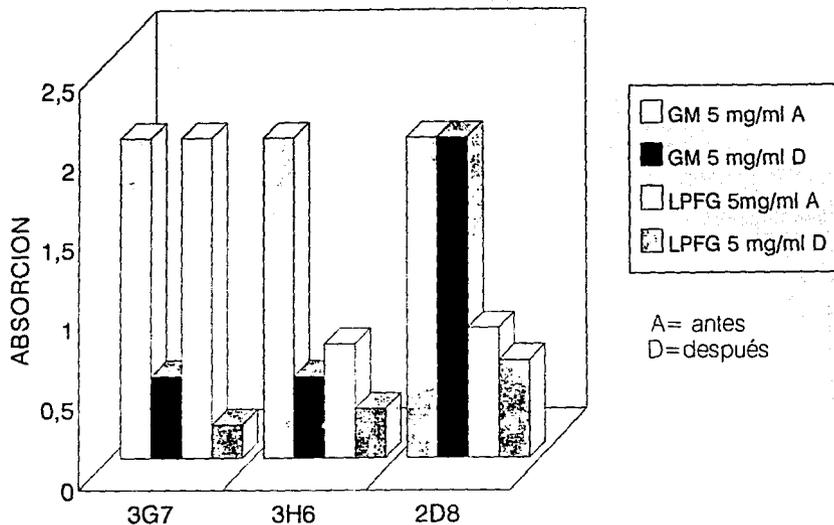
ANTIGENO GM ANTIGENO LPFG

	Dil(1:100)	Dil(1:200)	Dil(1:100)	Dil(1:200)
1	22	25	291	253
2	18	155	176	136
3	14	14	71	44
4	8	52	204	165
5	15	97	205	146
6	28	16	54	34
7	71	35	201	130
8	33	33	93	81
9	30	30	18	13
SN1	75	50	190	148
SN2	65	24	246	149
SN3	62	17	200	131
AHA1	146	163	105	95
AHA2	174	136	158	164

Tabla III. Muestra la Absorción de los sueros de paciente obtenida por el método de ELISA.
 SAHA:suero de paciente con Absceso Hepático ambiano.
 SN: Sobrenadante del Líquido del AHA centrifugado
 AHA:Absceso Hepático Ambiano directo.

La gráfica VI presenta comparativamente los resultados de el método de ELISA de los sobrenadantes de los líquidos de ascitis con los antígenos de GM y LPPG antes y después del tratamiento con metaperyodato sódico. Se observa que dos de los sobrenadantes disminuyen considerablemente su valor de absorción después del tratamiento frente al antígeno GM y solo un líquido de ascitis es afectado en su respuesta post-tratamiento frente a LPPG.

ELISA. ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-GM TRATAMIENTO CON METAPERIODATO



GRAFICA VI

MICROSCOPIA ELECTRONICA.

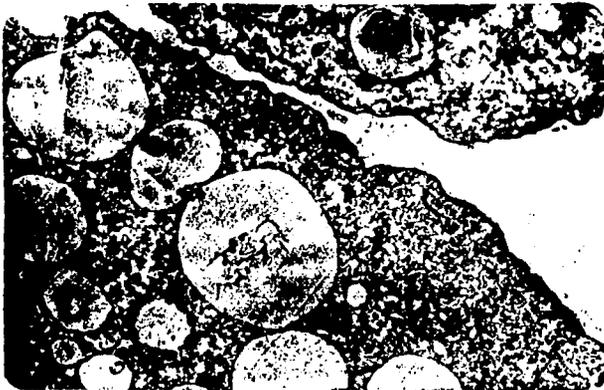


Imagen al microscopio electronico de un trofozoito de Entamoeba histolytica. Identificación del epitope por anticuerpo monoclonal 3G7. Se puede observar en la membrana del trofozoito la tinción positiva (2000 x)

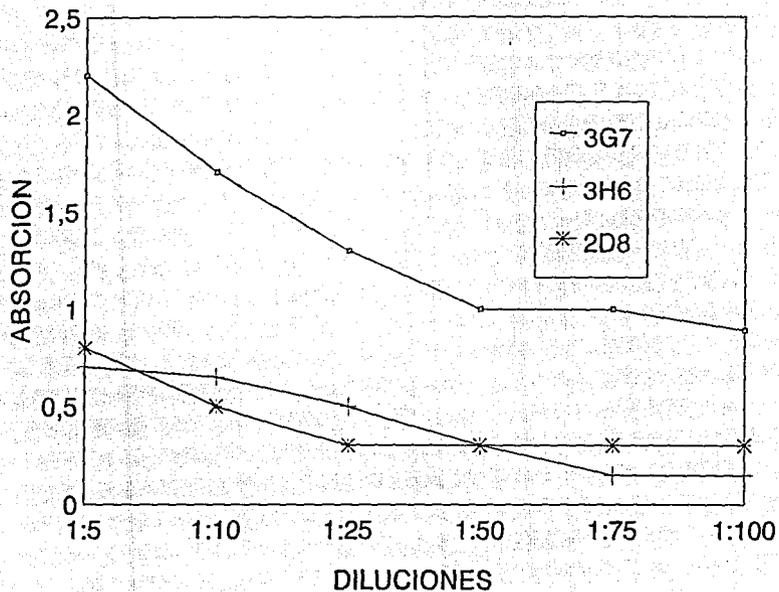
FALLA DE ORIGEN



Imagen al microscopio electrónico de un trofozoito de Entamoeba histolytica en presencia de sobrenadante de 2D8. Se observa que en la membrana del trofozoito no se produce reacción alguna, siendo la tinción negativa (2000 x) .

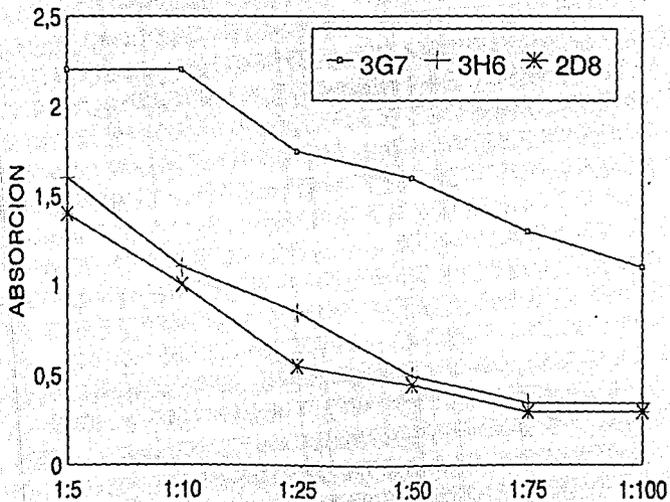
Se determinó la concentración óptima a la que debían emplearse los líquidos de ascitis para la ELISA que evaluaría la reacción cruzada entre GM y LPFG. En las gráficas VII y VIII se observa la titulación por ELISA de los líquidos de ascitis para elegir la concentración óptima

ELISA. TITULACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-GM ANTIGENO GM



GRAFICA VII

ELISA. TITULACION DE MONOCLONALES ANTI-GM ANTIGENO LPFG



DILUCIONES
GRAFICA VIII

La tabla IV muestra los resultados de la inhibición por azúcares de los antígenos GM y LPFG determinada por el método de ELISA. Solo se reportan los seis azúcares con mayor importancia inmunológica.

Azúcar	Antígeno GM			Antígeno LPFG		
	3G7	3H6	2D8	3G7	3H6	2D8
N-acetil-D-glucosamina	69.41	78.94	68.67	68.80	88.58	87.41
α -metil-D-glucosido	63.77	65.83	39.32	46.31	78.24	67.63
N-acetil-D-galactosamina	53.77	77.89	77.88	54.02	84.61	84.96
Sacarosa	52.38	84.27	71.14	40.71	90.93	82.98
α -metil-D-manosido	52.55	56.07	20.73	16.30	59.28	43.28
Manosa	49.18	43.74	19.15	11.91	51.87	53.56

Tabla IV. Muestra el porcentaje de inhibición por azúcares de los antígenos GM y LPFG presentes en la membrana de Entamoeba histolytica

ANALISIS
DE
RESULTADOS

El aislamiento de membranas de Entamoeba histolytica practicado por el método de Aley (1980) resultó exitoso ya que los porcentajes de proteína obtenida para las diferentes fracciones de membrana (MI, MP, y MNV) no difieren notoriamente a los reportados por el mismo Aley y col. la diferencia se debe con seguridad a que ellos trabajaron con la cepa HK9:NIH, de baja patogenicidad.

El porcentaje de proteína presente en las membranas constituye un total de 34.07 % (expresadas en mg son 24.1 mg) mientras que las fracciones carbohidratadas están presentes en un promedio total de 6.15 mg, de esta manera la relación carbohidrato-proteína que por naturaleza se encuentra en las membranas se da en una proporción de 0.21 mg de carbohidratos por cada mg de proteína, lo cual nos indica que los carbohidratos constituyen significativamente la membrana de Entamoeba histolytica.

La membrana plasmática del trofozoito juega un importante papel en la interacción parásito-hospedero; varias moléculas se han identificado como mediadores en el ataque inicial y de entrada del parásito a células, es decir, sirven de factor de virulencia o interactúan con una capacidad inmunomodulatoria (alta o baja regulando una respuesta inmune) con el hospedero (66). Se ha establecido que las glucoproteínas de la membrana están relacionadas con fenómenos de reconocimiento celular con funciones de adhesividad y con características de antigenicidad (20). La adherencia de los trofozoitos de Entamoeba histolytica a colonias mucilaginosas y epitelio es un paso inicial en la colonización e invasión del intestino delgado. La adherencia también es requerida para el efecto inmune de las células K, neutrófilos y macrófagos contacto dependientes (118).

Se han identificado varios antígenos de Entamoeba histolytica entre los más notables con un peso molecular de 170, 90, 59 y 37 kD, reportados por varios grupos (119-121). Se ha demostrado la presencia de antígenos de 49, 90 y 111 kD en amibas lisadas y un antígeno de 39 kD en preparaciones de membranas aisladas (121). Debido a que los antígenos tienen la capacidad de unirse a la lectina concanavalina A específica para glucosa o manosa se estableció que su composición es carbohidratada o bien son moléculas complejas con carbohidratos en su estructura.

Agundis y colaboradores (108) reportaron un antígeno glucoproteico de membrana GM de 30-35 kD en Entamoeba histolytica que es reconocido en su porción polisacárida por anticuerpos monoclonales de la

clase IgM. Por otra parte en 1982 Isibasi y colaboradores extrajeron un antígeno de superficie de Entamoeba histolytica rico en polisacárido el cual caracterizaron por métodos inmunoquímicos y lo denominaron LPPG.

Como principio el presente estudio se desarrolló en torno a la importancia que tienen las fracciones carbohidratadas de los antígenos de membrana GM y LPPG de Entamoeba histolytica y además se probó que ambas moléculas presentan reacción cruzada (por medio de la porción polisacáridica) en la respuesta inmune del hospedero. Por lo que este estudio reporta la identificación y caracterización preliminar de dichos antígenos a través del ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) con sueros inmunes de conejo, ratón y humano y con anticuerpos monoclonales.

Podemos apreciar en las gráficas I y II que los sueros de conejo anti-membranas (MI, MP y MNV) de Entamoeba histolytica reconocen al antígeno GM en una dilución de 1:1600 de forma considerable alcanzando valores de absorción que van de 0.8 a 1, mientras que el antígeno LPPG es también reconocido pero en menor grado y a una concentración 8 veces mayor (dil 1:200) con valores de absorción que van de 0.41- 0.68. Las gráficas comparativas III, IV, y V muestran en forma particular la especificidad de los sueros de conejo anti-membranas para el antígeno GM, sin embargo el hecho de que estos sueros reconozcan positivamente la LPPG significa que ambos antígenos comparten componentes similares entre sí. Por otra parte la reacción que se obtuvo por ELISA del suero anti-GM de ratón con GM y LPPG fue positiva hasta la dilución 1:1000 sin mostrarse ninguna diferencia en el reconocimiento de ambos antígenos.

Aust- Kettis y col.(1983) (119), identificaron 7 proteínas en la amiba que son reconocidas por suero inmune, estas proteínas incluyen un antígeno de 37 kD. Bhattacharya (1990)(122) reporta en sueros de paciente con amibiasis invasora la presencia de una banda predominantemente visible por autoradiografía de 40 kD, dicho antígeno al parecer es una proteína integral de la membrana de la amiba, su composición no es del todo clara sin embargo sugiere la presencia de una fracción larga de componentes no polipeptídicos (quizá carbohidratos).

Línder (123) reporta anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de trofozoitos de Entamoeba histolytica de 67 kD y 40 kD de peso molecular, de los cuales el antígeno de 67 kD es reconocido por sueros de pacientes con amibiasis, el antígeno de 40 kD es reconocido por sueros de paciente incluyendo sueros con anticuerpos naturales pero interesantemente no por los controles.

En la tabla III se observa como los sueros de paciente con absceso hepático amibiano reaccionan positivamente con los antígenos de membrana identificados como GM y LPFG. Nótese la concentración a la que se emplearon los antígenos, la cual a pesar de ser baja mostró una reacción positiva.

Estos resultados sugieren que los antígenos de alrededor de 40 kD son inmunológicamente importantes para el parásito Entamoeba histolytica.

Entamoeba histolytica produce proteínas capaces de formar poros en bicapas lipídicas artificiales y células blanco de membrana, esta proteína tiene una masa molecular de 28-30 kD en estado natural y de 13-15 kD bajo condiciones de desnaturalización-reducción. Esta proteína es llamada ameboporo.

Leippe y col. en 1993 (45) compararon la capacidad asesina de aislados patógenos y no patógenos de Entamoeba histolytica, evaluando su capacidad para formar poro, al parecer los péptidos presentan dos α -hélices anfipáticas consideradas cruciales para la función formadora de poro. Encontraron que la amiba patógena y no patógena mataba neutrófilos humanos *in vitro* pero que la amiba no patógena fue en tiempo menos eficiente que la amiba patógena; es decir, la amiba no patógena también destruía los neutrófilos solo que requería de aproximadamente tres lapsos de tiempo más que el requerido por la amiba patógena.

La importancia de los carbohidratos en la respuesta inmune ha sido comprobada por numerosos estudios. Con respecto a ello se han identificado y purificado la lectina galactosa de la cepa HM1-IMSS de Entamoeba histolytica con zimodemo patógeno. Esta es una glucoproteína heterodimérica de 260 kD, la cual está constituida por una subunidad pesada de 170 kD unida por enlaces disulfuro a una subunidad ligera de 35 kD. Esta lectina regula *in vitro* la adherencia de glucoproteínas a células de colonias mucilaginosas en humano, lo que ha hecho que se proponga su participación en la colonización inicial del colon (124). Se ha secuenciado el DNA de la subunidad de 170 kD, esta secuencia sugiere que es una proteína integral de la membrana de amplio dominio (125).

Se ha encontrado que los anticuerpos anti-galactosa constituyen un excelente medio para diferenciar cepas de Entamoeba histolytica con zimodemo patógeno de cepas con zimodemo no patógeno ya que se encontró que anticuerpos antilectina muestran que la subunidad pesada de 170 kD está presente en cepas no patógenas (126). Mann (46) reporta 5 anticuerpos monoclonales humanos para la lectina

galactosa, los cuales fueron sensibles a tratamiento con peryodato. Lo anterior nos refuerza la importancia que tiene el antígeno GM que es de un peso molecular aproximado a 40 kD que al parecer son específicos de las cepas patogénicas.

Cuando se probaron por ELISA los sobrenadantes de los anticuerpos monoclonales con los antígenos GM y LPFG tratados con metaperiodato encontramos que el reconocimiento por parte de cada monoclonal tiene diferente especificidad al epítipo carbohidrato, así tenemos que el monoclonal 3G7 reconoce de manera más específica la fracción carbohidratada de ambos antígenos, a su vez el anticuerpo monoclonal 3H6 es parecidamente específico para GM como el 3G7 no así para la LPFG, al cual reconoce en menor grado antes y después del tratamiento, por su parte el monoclonal 2D8 al parecer es menos específico para reconocer las fracciones carbohidratadas de GM y LPFG. Esto constituye una evidencia más de que las fracciones carbohidratadas desempeñan un papel importante en la respuesta inmune.

El estudio de reacciones cruzadas en la respuesta inmune constituye un parámetro importante de analizar, así se ha evaluado que en el Lupus eritematoso sistémico (LES) enfermedad reumatoide autoinmune existe reacción cruzada entre anticuerpos IgG anti-DNA y anti-cardiolipina (127).

En lo que respecta a Entamoeba histolytica pruebas electroforéticas con antisuero al péptido formador de poro, purificado de un aislado patogénico revelan que la forma no patógena contiene un péptido de reacción cruzada con masa molecular similar (3.5 kD). Una electroforesis revela que la reacción cruzada peptídica absorbió a los liposomas (45).

También se ha descrito la importancia que tiene el sistema de complemento como mecanismo de defensa primaria a los agentes de infección. Los trofozoitos de la ameba resisten el complemento, lo que puede ser un factor importante en el progreso de la enfermedad. La lectina galactosa inhibe la actividad del complemento de membrana atacando al complejo C5b-9 a nivel de C8 y C9 (128). Porciones de la secuencia de la lectina se identifican con componentes del complemento C8 y C9 y con CD59 y un inhibidor de C5b-9 en eritrocitos humanos. La lectina también tiene porciones antigénicas de reacción cruzada con CD59 (46).

Los resultados de la inhibición por azúcares de los antígenos y LPFG determinados por ELISA muestran la presencia de azúcares inmunodominantes en ambas moléculas. Así se puede observar que los azúcares con importancia inmunológica en GM y LPFG son: N-acetil-D-glucosamina, α -metil-D-glucosido, N-acetil-D-galactosamina, Sacarosa, α -metil-D-manosido y manosa, los cuales son monosacáridos y oligosacáridos. La LPFG posee manosa, glucosa, galactosa y

glucosamina lo cual nos hace sugerir que la manosa es la única que como monosacárido actúa en la respuesta inmune de Entamoeba histolytica, mientras que los otros monosacáridos tienen que combinarse con grupos amino, metilo e incluso con otro monosacárido para tener importancia inmunológica. Observamos en la tabla IV que los valores por inhibición de azúcares de ambos antígenos GM y LPFG son muy parecidos por lo que se sugiere que dichas moléculas poseen carbohidratos similares y por ende presentan reacción cruzada por azúcares a nivel de membrana de Entamoeba histolytica.

Por otra parte resulta importante mencionar que Leippey y col. (129) proponen que el estado natural del ameboporo constituye un dímero de 28-30 kD y que su naturaleza anfipática puede hacer que la parte exterior de la α - hélice hidrofóbica sea capaz de interactuar con compuestos hidrocarbonados de las bicapas lipídicas. Esto constituye un antecedente importante que involucra la interacción entre proteínas-hidrocarbonadas en la respuesta inmune de Entamoeba histolytica.

CONCLUSIONES

- 1.- Las fracciones carbohidratadas participan de manera importante en la respuesta inmune de Entamoeba histolytica.
- 2.- Los sueros de paciente con AHA reconocen ambos antígenos GM y LPPG.
- 3.- Los anticuerpos monoclonales anti-GM de ratón reconocen al LPPG .
- 4.- El antígeno GM se localiza a nivel de membrana.
- 5.- Existe reacción cruzada por azúcares entre los antígenos GM y LPPG.

El presente trabajo contribuyó a la caracterización inmunológica de los antígenos de superficie GM y LPPG presentes en Entamoeba histolytica.

El hecho de que los antígenos GM y LPPG sean reconocidos tanto por sueros de paciente como por sueros de ratón, conejo y por los monoclonales anti-GM habla de la gran importancia de los antígenos carbohidratados en el reconocimiento de Entamoeba histolytica además ambos son moléculas de superficie con azúcares inmunodominantes comunes por lo que resulta interesante emplear los monoclonales anti-GM en el montaje de un método diagnóstico (proyecto actualmente desarrollado por la QFB. Concepción Agundis M. del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM) y para la elaboración de una vacuna eficaz. Ambas alternativas con amplias posibilidades de aplicación.

LITERATURA

CITADA

LITERATURA CITADA

- 1.- Guerrant, R.L. 1986. The global problem of amebiasis: current status research needs, and opportunities for progress. *Revs. Infect. Dis.* 8(2): 218-227.
- 2.- Diamond, L.S., Harlow, D.R., Curnick, C. 1978. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. *Trans. R. Trop. Med. Hyg.* 72(4): 431-432.
- 3.- Perla - Valasco, A., Treviño - García, N., Ruiz I. 1972. Mulcopolisacáridos en el glicocálix de Entamoeba histolytica. Estudio citolítico de alta resolución. *Arch. Invest. Med. (Méx)* 3 (suppl.2):302-307.
- 4.- Cosgrove, W.B., and Hanson, W.L. 1962. Partial characterization of polysaccharide from the trypanosomi flagellate, Critthidia fasciculata. *American Zoologist.* 2:401.
- 5.- Von Brand, T., Mc. Mahon, P., Tobie, E.J., Thompson, M. J., and Mosettig, E. 1959. Chemical composition of culture form of Trypanosoma cruzi. *Experimental Parasitol.* 8: 171-181.
- 6.- Gottlieb, M., Lanzeta, P., and Berech, J. 1972. Critthidia fasciculata characterization of polysaccharide. *Exp. Parasitol.* 32:206-210.
- 7.- Gottlieb, M. 1977. A carbohydrate-containing antigen from Trypanosoma cruzi and its detection in the circulation of infected mice. *J. Immunol.* 119(2):465-470.
- 8.- Lederkremer, R.M., Alves M.J.M., G.C., and Colli, W. 1976. A lipopeptidophosphoglycan from Trypanosoma cruzi (epimastigote) Isolation, purification and carbohydrate composition. *Biochem. Biophys. Acta.* 444:85-96.
- 9.- Bailey, C.P., and Bowers, B. 1981. Localization of lipophosphoglycan in membrane of Acanthamoeba by using specific antibodies molec. and cell Biol. 1:358-369.
- 10.- Dearborn, D.G., Smith, S., and Korn, E.D. 1976. Lipophosphoglycan of the plasma membrane of Acanthamoeba castellanii. *J. Biol. Chem.* 251:2976-2982.
- 11.- Korn, E.D. Dearborn, D.G. and Wright, P. 1974. Lipophosphoglycan of plasma membrane of Acanthamoeba citellani. Isolation from whole amoebae and identification of water-soluble products of acid hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 249: 3335-3341.

- 12.- Lushbaugh, W.B. and Miller, J.H. 1974. Fine structural topochemistry of Entamoeba histolytica Shauddinn, 1903. *J. Parasitol.* 60:421-433.
- 13.- Pinto da Silva, P., Martinez- Palomo, A., and González - Robles, A. 1975. Membrane structure and surface coat of Entamoeba histolytica. *J. Cell. Biol.* 64:538-550.
- 14.- Martínez - Palomo, A., González- Robles, A. and de la Torre, M. 1973. Selective agglutination of pathogenic strains of Entamoeba histolytica induced by concavalina A. *Nature. New Biol.* 245:186-187.
- 15.- Isibasi, A., Garcia Tamayo, F., y Kumate, J. 1976. Polisacáridos obtenidos de Entamoeba histolytica en cultivo axénico. Memorias de la conferencia internacional sobre amibiasis. Eds. Sepúlveda, B. y Diamond, L.S., IMSS. México. 82-86.
- 16.- Isibasi, A., Sánchez, N., Garcia Tamayo, F. y Kumate, J. 1978. Serología con polisacáridos de Entamoeba histolytica. *Arch. Invest. Med. (Mex)*, 9 (Supl.1):285 - 289.
- 17.- Westphal, O. and Jann, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water further applications of the procedure. *Methods of carbohydrate chemistry*, Eds. Whistler, R.A., Bemiller, J.N. and Walfrom, A.L. New York. Academic Press. 5:93-95.
- 18.- Isibasi, A., Cruz, S.M. Cottlieb, M y cols. 1986. Purification of the polysaccharide portion of the lipopeptidophosphoglycan extracted from trophozoites of HK-9 strain of Entamoeba histolytica. *Arch. Invest. Med. (Mex)* 17 (supl.1):73.
- 19.- Aley, S.B., Scott, W.A. and Cohn, Z.A. 1980. Plasma membrane of Entamoeba histolytica. *J. Exp. Med.* 152:391-404.
- 20.- Torian, B.E., Reed, S.L. Flores., Creely., Cward., Vidal and Stamm. 1989. The 96-kilodalton antigen as an integral membrane protein pathogenic Entamoeba histolytica: Potential differences in pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infection and Immunity.* 58:753-760.
- 21.- Bos, H.J. 1973. The problem of pathogenicity in parasitic Entamoeba. *Acta Leidensia.* 40. 1-12.
- 22.- Petri W. A., and Ravdin, J. I. 1991. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose- specific adherence lectin of Entamoeba histolytica. *Infection and Immunity.* 59. 97-101.

- 23.- Lin, Y., Keller, K and Chadee K. 1993. Entamoeba histolytica proteins modulate the respiratory bursts potential by murine macrophages. Immunology 78:291-297.
- 24.- Ravdin, J.I., and Guerrant, R.L. 1982. A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. Revs. Infect. Dis. 4(6):1185-1207.
- 25.- Jeffey, H.C and Leach, R.M. 1975. Atlas of medical helminthology and protozoology. Churchill Livingston eds. Edinburgh London. secon edition. .
- 26.- Kumate, J., 1980. Amibiasis. Manual de Infectología. septima ed. 56-57.
- 27.- Ludvik, J., Shipstone, A.C. 1970. The ultrastructure of Entamoeba histolytica. Bull. World Health Org. 43:301-308.
- 28.- Feria -Velasco, A., Treviño, N. 1972. The ultrastructure of trophozoites of Entamoeba histolytica with particualr reference to spherical arrange ment of osmniophilic cylindrical bodies. J. Protozool. 19: 200-211.
- 29.- Sawyer, M.K., Bischoff, J.M., Guidry, M.A., Reeves, R.E. 1967. Lipids from Entamoeba histolytica Exp. Parasitol. 20:295-302.
- 30.- Kittredge, J.S., Roberts, E. 1969. A carbon-phosphorous band in nature. Science. 164: 37-42.
- 31.- Rivera, P., Carabez - Trejo, A., Cortés, L.F., Isibasi, A., Kumate, J. 1985. Immunochemical characterization of Entamoeba histolytica plasma membranes own and culture medium antigens. Arch. Invest. Med. (Méx) 15:405-416.
- 32.- Parkhouse, M., Cid, M.E., Calderón, J. 1978. Identificación de antígenos de membrana de Entamoeba histolytica con anticuerpos de pacientes de amebiasis. Arch. Invest. Med. (Méx) 9 (1):211-218.
- 33.- Rosenberg, I., Gitler, C. 1985. Subcellular fractionation of amoebapore and plasma membrane components of Entamoeba histolytica using self - generating Percoll gradients. Mol. Biochem. Parasitol. 14:231-238.
- 34.- Gitler, C., Calef, E., Rosenberg, I.M. 1984. Cytopathogenicity of Entamoeba histolytica . Phil Trans. R. Soc. London. 307:73-85.
- 35.- Blagi, F.F., Beltran, H.F., Ortega, P.S. 1966. Remobilization of Entamoeba histolytica after exposure to immobilizing antibodies. Exp. Parasitol. 18:87-91.

- 36.- Aust Kettis, A., Sundqvist, K.G. 1978. Dynamics of the interaction between Entamoeba histolytica and components of immune response I. Capping and endocytosis; influence of inhibiting and accelerating factors; variation of the expression of surface antigens. Scand. J. Immunol. 7:35-44.
- 37.- Calderón, J., Muñoz, L., Acosta, H.M. 1980. Surface re-distribution and release of antibody induced caps in Entamoeba. J. Exp. Med. 151:184-193.
- 38.- Martínez- Palomo. 1982. The biology of Entamoeba histolytica. John Wiley & Sons. Ltd, Great Britain. 161 pags.
- 39.- Garfinkel, L.I., Gilagi, M., Huber, M., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M. and Rozenblatt, S. 1989. DNA probes specific for Entamoeba histolytica possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. Infect. Immun. 57:926-931.
- 40.- Tannich, E., Horstmann, R.D., Knobloch, J. and Arnold, H. H. 1989. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:5118-5122.
- 41.- Clark, C.G., and Diamond, L.S. 1991. Ribosomal RNA genes of pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica are distinct. Mol. Biochem. Parasitol. 49:297-302.
- 42.- Ravdin, J.I. 1989. Entamoeba histolytica: from adherence to enteropathy. J. Infect. Dis. 159:420-429.
- 43.- Ravdin, J.I., Croft, B.Y., and Guerrant, R.L. 1980. Cytotoxic mechanisms of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152:377-390.
- 44.- Kollaritsch, H., Graf, J., Stemberger, H., Krumpolz, B., Binder, M., Scheiner, O., and Wiedermann, G. 1989. Interaction of different of Entamoeba histolytica with target cells characterization of electrophysiological and morphological features Immunobiology. 179:190-201.
- 45.- Leippe M., Bahr, E., Tannich E., and Horstmann, R.D. 1993. Comparison of pore-forming peptides from pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica. Mol. Biochem. Parasitol. 59:101-110.
- 46.- Mann, B.J., Chung, C.Y., Dodson, J. M., Ashley, L.S., Braga, L.L and Shodgrass, T. L. 1993. Neutralizing monoclonal antibody epitopes of the Entamoeba histolytica galactose adhesin map to the cyteine rich extracellular domain of the 170 kilodalton on subunit. Infection and Immunity. 61:1772-1778.

- 47.- World Health Organization Expert Committee Amoebiasis. 1969. WHO. Lech Rep. Ser. No. 421:1-52.
- 48.- Walsh, J.A. 1986. The world problem of amebiasis: current status, research and opportunities for advancement. In Tropical and Geographic Medicine, Ed. K.S. Warren, A.A.F. Mahmoud. New York. Mc. Graw- Hill.
- 49.- Calderón, J., Tovar, R. 1986. Loss of susceptibility to complement lysis in Entamoeba histolytica HMI by tratment with human serum Immunology. 58: 467-471.
- 50.- Lusbaugh, W.B., Kairalla, A.B. Hofbaver, A.F., Arnaud, P., Cantey, J.R. and Pittman, F.E. 1981. Inhibition of Entamoeba histolytica cytotoxin by alpha 1 antiprotease and alpha 2 macroglobulin. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30:575-585.
- 51.- Bos, H. J. and Van den Ejik, A.A. 1980. Serum inhibited toxicity of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx) 11 (Supl. 1) : 135-141.
- 52.- Pérez - Montfort, R., Ostoa- Saloma, P. Velazquez, M, L., Montfort, I., Becker, I. 1987. Catalytic classes of proteinases of Entamoeba histolytica. Mol. Biol Chem. Parasitol. 26:87-97.
- 53.- Tannich, E., Nickel., Buss, H. and Horstmann, R.D. 1992. Mapping and partial sequencing of the genes coding for two different cysteine proteinases in pathogenic Entamoeba histolytica. Mol. Biochem. Parasitol 54:109 - 112.
- 54.- Lushbaugh, W.B., Hofbaver, A.F., Pittman, F.E. 1985. Entamoeba histolytica: purification of cathepsin B. Exp. Parasitol. 59:328-333.
- 55.- Scholze, H., Werries, E. 1984. A weaky acidic protease has a powerful proteolytic activity in Entamoeba histolytica. Mol. Biochem. Parasitol. 11:293-300.
- 56.- Luaces, A.L., Barrett,A.J. 1988. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of Entamoeba histolytica. Biochem. J. 250:903-907.
- 57.- Ostoa- Saloma, P., Cabrera, N., Becker, I. and Perez-Montfort, R. 1989. Proteinases of Entamoeba histolytica associated with diferent subcellular fractions. Mol. Biochem. Parasitol. 32:133-144.
- 58.- Avila, E.E. y Calderón, J. 1993. Entamoeba histolytica trophozoites: a surface - associatwed cysteine protease. Exp. Parasitol. 76. 232-241.

- 59.- Muñoz, M.D., Calderón J. Rojkind, M. 1982. The collagenase of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 155:42.
- 60.- Reeves, R.E., Bischoff, J.M. 1968. Classification of Entamoeba species by means of electrophoretic properties of amebal enzymes. J. Parasitol. 54: 594-600.
- 61.- Sargeant, P.G., Williams, J.E. 1978. Electrophoretic isoenzyme patterns of Entamoeba histolytica and Entamoeba coli. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 164-166.
- 62.- Sargeant, P.G., Williams, J.E. Neal. R.A. 1980. A comparative stud of Entamoeba histolytica (NIH-200:HK9, etc), "Entamoeba histolytica- like" and other morphologically identical amoebae usingan isienzyme electrophoresis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74: 469-474.
- 63.- Sargeant, P.G., Willams, J.E. 1982. Study of intestinal protozoa including non- pathogenic Entamoeba histolytica from patients in a group of mental hospitals. Am. J. Public Health. 72:178-179.
- 64.- Sargeant, P.G., Willams, J.E. Bohojanani, R. 1982. A review of the isoenzyme characterizatiorn of Entamoeba histolytica with particular reference to pathogenic and non - pathogenic stocks isolated in Mexico. Arch. Invest. Med. (Méx). 13: 89-93.
- 65.- Strachan, W.D., Chiodini, P.L. Spice, W.M., Moody, A.H., Ackers, J.P. 1988. Immunological diferentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of Entamoeba histolytica.Lancet. i:561-563.
- 66.- Tachibana, H. Kobayashi, S., Kato, Y. Nagakura, K., Kaneda, and Takeuchi, T. 1990. Identification of pathogenic isolate- specific 30,000-Mr antigen of Entamoeba histolytica using a monoclonal antibody.Infect. Immun. 58:955-960.
- 67.- Chadee, K., Smith, J.M., Merovitch, E. 1985. Entamoeba histolytica electrophoretic isoenzyme patterns strains and their virulence in the cecum of gerbils. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34: 870-878.
- 68.- Mirelmen, D., Bracha, R., Aust- Kettis, A. 1985. Effects of culture conditions on virulene and zymodemes of non pathogenic and pathogenic strains of Entamoeba histolytica X. International Seminar on amoebiasis, Mexico.
- 69.- Gitler, C., Mirelman, D. 1980. Factors contributing to the pathogenic behavior of Entamoeba histolytica. Ann. Rev. Microbiol. 40:237-261.

- 70.- Keene, W.E., Pettit, M.G., Allen, S., Mc Kerrow, J.H. 1986. The major neutral proteinase of Entamoeba histolytica. Exp. Med. 163:536-549.
- 71.- Reed, S.L., Keene, W.E., Mc Kerrow, J.H. Gigli, I. 1989. Thiol proteinase expression correlates with pathogenicity of Entamoeba histolytica. J. Clin. Microbiol. 27:2772-2777.
- 72.- Redd, S.L., Sargeant, P.G., Braude, A.I., 1983. Resistance to lysis by human serum of pathogenic Entamoeba histolytica. J. Immunology. 143:189-195.
- 73.- Biagi, F.F. Robledo, E., Servin, H., Martuscelli, A. 1962. The effect of cholesterol on the pathogenicity of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 11:333-340.
- 74.- Stuiver, P.C., Gould, T.J.L. 1978. Corticoidsteroids and liver amoebiasis. Br. Med. J. 2: 394- 395.
- 75.- Bracha, R., Mirelman, D. 1984. Virulence of Entamoeba histolytica trophozoites: effects of bacteria, microaerobic conditions and metronidazole. J. Exp. Med. 16: 353-368.
- 76.- Capin, R., Capin, V.R., Ortiz- Ortiz, L. 1980. Effect of complement depletion on the induction of amebic liver abscesses in the hamster. Arch. Invest. Med (Méx) 11:173-180.
- 77.- Ghadirian, E., Meerovitch, E. 1981. Effect of immunopression on the size and metastasis of amebic liver abscesses in hamsters. Parasite Immunol. 3: 329-338.
- 78.- Rosales-Encina, J.L., Schillie-G, M.A., Jimenez-D, D.B., Talamas - R,P., Matluk. 1992. Purification and partial characterization of and hemolytic activity from Entamoeba histolytica. Arch. Med. Res. 23(2):243-248.
- 79.- Flores, B.M., Reed, S.L., Ravdin, J.I and Torian B.E. 1993. Serologic reactivitic to purified recombinant and native 29-kilodalton peripheral membrane protein of pathogenic Entamoeba histolytica J. of Clin. Microbiol. 31: 1403-1407.
- 80.- De la Cruz, H.F., Arguello, C., Orozco, E. 1990. Identificación y localización de moléculas que intervienen en la interacción entre Entamoeba histolytica y células epiteliales. Arch. Invest. Med. (Mex) (supl.1):267-272.
- 81.- Rosales-Encina, J.L., Meza, I., Lopez-De-Leon, A., Talamas-R, P., Rojkind. 1987. Isolation of a 220 kilodalton protein whit lectin properties from a virulent strain of Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 156(5):790-797.

- 82.- Trissl, D. 1982. Immunology of Entamoeba histolytica in human and animal hosts. Rev. Infect. Dis. 4:1154-1184.
- 83.- Juniper, K., Warrell, C.L., Minshew, M.C., Roth, L.S., Cypert, H., Lloyd, R.E. 1972. Serologic diagnosis of amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21: 157-168.
- 84.- Krupp, I.M. 1970. Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. Am. J. Trop. Med. 19: 57-62.
- 85.- Elsdon - Dew, R. 1970. The serology of amoebiasis- Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 64:18.
- 86.- Healy, G.R. Kagan, I.G., Gleason, N. N. 1970. Use of the indirect hemagglutination test in some studies of seroepidemiology of amebiasis in the western hemisphere. Health Laboratory Science. 7:109-116.
- 87.- Healy, G.R., Visvesvara, G.S., Kagan, I.G. 1974. Observation on the persistence of antibodies to Entamoeba histolytica. Arch. Invest.Med. (Méx) 5 (Supl. 2): 495- 500.
- 88.- Ghadirian, E., Meerovitch, E., Hartman, D.P. 1980. Protection against amebic liver abscess in hamsters by means of immunization with amebic antigen and some of its fractions. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29:779-784.
- 89.- Tsutsumi, V., Mena - López, R. Anaya- Velázquez, F., and Martínez- Palomo, A. 1984. A cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. Am. J. Pathol. 117: 81-91.
- 90.- Henson, P.M & Johnston, R.B. Jr. 1987. Tissue injury in inflammation : oxidants, proteinases, and cationic proteins. J. Clin. Invest. 79: 669.
- 91.- Docampo, R. & Moreno, S.N. J. 1984. Free-radical intermediates in the antiparasitic action of drugs and phagocytic cells. In: Free radicals in Biology. (ed. W. A. Pryor),. vol..VI:243. Academic Press Inc., New York.
- 92.- Schoolnick, G.K., Buchanan, T.M & Holms. K. 1976. Gonococci causing disseminated gonococcal infection are resistance to the bactericidal action of normal human sera. J. of Clin. Invest. 58: 1163-1173.
- 93.- Santoro, F., Bernal, J. & Capron, A. 1979. Complement activation by parasites. Acta Tropica. 36:5-14.
- 94.- HawKing, F. 1976. The resistance to human plasma of Tripanosoma brucei, T. rhodesiense and T. gambiense. Tras. of Royal Soc. Trop. Med and Hyg. 70:504-513.

- 95.- Manchado, A.J. Gazzinelli.G., Pellegrino, J. & Da Silva, W. 1975. Schistosoma mansoni: The role of complement C3 activating system in the cercaricidal action of normal serum. Exp. Parasitology. 38:20-29.
- 96.- Huld, G., Davies, P., Allison, A.C. and Scholmer, H.V. 1979. Interactions between Entamoeba histolytica and complement. Nature. 227:214-216.
- 97.- Ortiz-Ortiz, L., Capin, W.R., Sepulveda, B., and Zamacón, G. 1978. Activation of the alternate pathway of complement by Entamoeba histolytica. Clin. Exp. Imm. 34:10-18.
- 98.- Salata, R.A., and Ravdin, J.I. 1985. The N-acetyl-D- galactosamine inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica II mitogenic activity for human lymphocytes. J. Infect. Dis. 151:816-822.
- 99.- Thompson, R.A. 1979. Immunologic mechanisms. In: Asquith, P. ed. Immunology of gastrointestinal tract. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- 100.- Bach, J-F. 1989. Inmunología. Ed. Ciencia y Técnica S.A. México.
- 101.- Beltran, F., Biagi, F., Ortega, P.L. y Rivas, C. 1985. Observaciones sobre la reacción de inmunofluorescencia y la reacción de inmovilización de Entamoeba histolytica Rev. Gastroenterol. Mex. 30:491-496.
- 102.- Brown, J.A. and Whitby, J.L. 1955. An immobilization test for amoebiasis. J. Clin. Path. 8:245-246.
- 103.- Yap, E.H., Aw, S.E. and Zaman, V. 1969. IgG as the main immobilization factor in rabbit antisera against Entamoeba. Experientia. 25:401-404.
- 104.- Boonpuknaving, S., and Nairn, R.C. 1967. Serological diagnosis of amoebiasis by immunofluorescence. J. Clin. Path. 20:875-878.
- 105.- Sepúlveda, B., Ortiz-Ortiz, L., Chávez, A., y Segura, M. 1974. Comprobación de la naturaleza inmunológica del efecto del suero y de la gamaglobulina inmunes sobre el trofozoito de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx). 5:(Supl.1):343-346.
- 106.- Outehterlony, O. 1953. Antigen-antibody reaction in gels. IV of reactions in coordinated systems of diffusion. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 32:2311-2315.

- 107.- Sepulveda, B., Chávez, A., Iturbe-A, I., Ortiz-Ortiz, L. 1973. Efecto de la gemaglobulina inmune antiambiiana sobre el trofozoito de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx) 4 (supl.1):79-86.
- 108.- Agundis, C., Isibasi, A., Ortiz, V., Reyes, J.L., Paniagua, J., Ramirez, A., Kumate, J. 1990. Obtención de anticuerpos monoclonales contra glicoproteínas de membrana externa de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx) 21 (supl.1):15-22.
- 109.- Agundis, C., Blanco, F., Toledo, Reta, F., Kumate, J & Isibasi, A. 1995. Recognition of sera from patient with amoebic abscess to 35 kD glycoprotein from Entamoeba histolytica. (enviado a publicación)
- 110.- Isibasi, A., Cruz, M.S., Ramirez, A. 1982. Immunochemistry of lipopeptidophosphoglycan extracted from trophozoites of Entamoeba histolytica HK-9 strain. Arch. Invest. Med. (Méx) 13 (Supl.3):51.
- 111.- Isibasi, A., Blanco, F., Arregín, C., Martí, C., Orozco, E., Kumate, J. 1990. Diferencias inmunológicas de un polisacárido de superficie obtenido de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx) 21 (Supl.1):170-181.
- 112.- Croos, G.A.M. 1975. Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of Tripansoma brucei. Parasitol. 71:393-417.
- 113.- Lawson, E.Q., Hedlund, B.E., Ericson, M.E., Mood, D.A., Litman, G.W., and Middaugh, R. 1983. Effect of carbohydrate on protein in solubility. Arch. Biochem. Biophys. 220(2):572-575.
- 114.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- 115.- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Roberts, P.A., and Smith, J. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:250-256.
- 116.- Kohler, G., y Miltstein, C. 1976. Fusion between immunoglobulin secreting and non secreting myeloma cell lines Eur. J. Immunol 6:292.
- 117.- Reynolds, E. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque strain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17:208-212.

- 118.- Ravdin, J.I., and Guerrant, R.L. 1981. Role of adherence in cytopathogenic mechanism of Entamoeba histolytica study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J. Clin. Invest. 68:1305-1313.
- 119.- August-Kettis, A., Tharnstenson, R., and Utter, G. 1993. Antigenic of Entamoeba histolytica strain NIH:200:A surver of clinically relevant antigenic components. Am. J. of Trop. Med. and Hyg. 32:512- 522.
- 120.- Joyce, M.P., and Ravdin, J.I. 1988. Antigens of Entamoeba histolytica recognized by immune sera from liver abscess patients. Am. J. Trop. Med. and Hyg. 38:74-80.
- 121.- Mathews, H.M., Moss, D.M., and Visvesvara, G. G.S. 1986. Analysis of antigens from membrane and soluble fractions of Entamoeba histolytica . J. Protozoology. 33: 324-328.
- 122.- Bhattacharya, A., Bhattacharya, S., Sharma, M.P., and Diamond, L.S. 1990. Metabolic labeling of Entamoeba histolytica Antigens: characterization of 28 kDa major intracellular antigen. Exp. parasitology. 70:255-263
- 123.- Linder, E., Lundin, L., Haglunds, S., Hallander, H., and Tellez, S. 1992. Identification of parasite-specific cytoplasmic 67 kDa Entamoeba histolytica antigen recognized by patient sera and monoclonal antibodies. Arch. Med. Research. 23(2):169-172.
- 124.- Chadee, K., Petri, W.A. Jr., Innes, D.J., and Ravdin, J.I. 1987. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit the adherence lectin of Entamoeba Histolytica. J. Clin. Invest. 80:1245-1254.
- 125.- Mann. B.J., and Petri, W.A.Jr. 1991. Cell surface proteins of Entamoeba histolytica. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:3248-3252.
- 126.- Petri, A.W., Jackson, F.H., Gathiram, V., Kress, K., Saffer, D.L., Snodgrass, L.T., Chapman, D.M., Keren, Z., and Mirelman, D. 1990. Pathogenic and nonpathogenic strains of Entamoeba histolytica can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. Infection and Immunity. 58(6):1802-1806.
- 127.- Eilat, D., Zlotnick, A.Y., & Fischel, R. 1986. Evaluation of cross-reaction between anti-DNA and anti-cadiolinip antibodies in SLE and experimental experimental animals. Clin. Exp. Immunol. 65:269-278.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 128.- Braga, L.L., Minomiya, H., McCoy, J.J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., Wood, S., Sims, P.J., and Petri, W.A., Jr. 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of Entamoeba histolytica. J. Clin. Invest. 90:1131-1137.
- 129.- Leippe, M., Ebel, S., Shoenberger O.L., Horstmann, R.D., and Muller-Eberhard, H.J. 1991. Pore-forming peptide of pathogenic Entamoeba histolytica. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:7659-7663.