

047



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE QUIMICA

PURIFICACION Y LOCALIZACION DE UN ANTIGENO DE SUPERFICIE EXTRAIDO POR EL METODO DEL FENOL-AGUA DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica DE LA CEPA HK-9 CULTIVADOS EN MEDIO AXENICO

# TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

JAVIER DE JESUS SOTO MONTANO

XALAPA, VER. 1982

T  
RC121  
.A5  
S6  
C.1



1080075099



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE QUIMICA

*[Handwritten signature]*

PURIFICACION Y LOCALIZACION DE UN ANTIGENO DE SUPERFICIE EXTRAIDO POR EL METODO DEL FENOL-AGUA DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica DE LA CEPA HK-9 CULTIVADOS EN MEDIO AXENICO

# TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

JAVIER DE JESUS SOTO MONTANO

XALAPA, VER.

1982



(75099)



X  
RC121  
"A S  
S6



# Unidad Docente Interdisciplinaria de Ingeniería y Ciencias Químicas

ZONA UNIVERSITARIA

TELEFONO 7-66-33

XALAPA, VER.

FECHA: 12 de Noviembre de 1982

OFICIO: 186/C.Q.

ASUNTO: AUTORIZACION

Al C.

JAVIER DE JESUS SOTO MONTANO

Pasante de la carrera de:


QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t e

Habiendo sido debidamente revisada y aceptada la Tesis Profesional presentada por Usted denominada: " PURIFICACION Y LOCALIZACION DE UN ANTIGENO DE SUPERFICIE EXTRAIDO POR EL METODO DEL FENOL-AGUA DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica DE LA CEPA HK-9 CULTIVADOS EN MEDIO AXENICO ", y estando de acuerdo con los Profesores que integran el jurado de revisión escrita, que es satisfactorio su contenido para sustentar Exámen Profesional, AUTORIZO a Usted a que proceda a la impresión del citado trabajo.

A t e n t a m e n t e

  
UNIDAD INTERDISCIPLINARIA DE  
INGENIERIA Y CIENCIAS QUIMICAS  
FACULTAD DE INGENIERIA  
XALAPA, VER.



I.Q.A. L. OMAR JAMED BOZA  
DTOR. INT. DE LA FAC. DE C. Q.

EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACION FUE REALIZADO EN LA DIVISION DE INMUNOQUIMICA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA - DEL CENTRO MEDICO NACIONAL - IMSS AL DIGNO CARGO DEL DR. EN C. JESUS KUMATE R. Y BAJO LA DIRECCION DEL DR. EN C. ARMANDO ISIBASI A.

A mi Padre

A mi Madre

A mis hermanos

A mi Jurado:

Q.F.B. Cristina Díaz de Z.

Q.B.P. Ernesto Rocas T.

Biol. Aracely Ramírez R.

A mis amigos



A:

Q.F.B. Elizabeth Woodhouse

Q.F.B. Irma Uscanga de A.

Q.F.B. Martha Flores M.

M.V.Z. Antonio Ramírez V.

mi especial agradecimiento.

. . . y a todas aquellas personas  
que de algún modo contribuyeron a  
la realización del presente.

Xavier.



- II.I.12.iv.- Morfología de E.histolytica
- II.I.12.v.- Morfología de la amebas humanas (Núcleos esquemáticos)
- II.I.12.vi.- Morfología de otras amebas parásitas del hombre
- II.I.12.vii.- Ciclo vital de E. histolytica
- II.I.12.viii.- Morfología de las formas características de E. histolytica durante su proceso de reproducción
- II.I.12.ix.- Espectro de acción antiamibiana de diversos medicamentos
- II.I.12.x.- Posibilidades de migración- De E. histolytica en el hombre
- II.I.12.xi.- Correlación entre las distintas etapas de migración de E. histolytica en el hombre y los diversos cuadros clínicos de la amibiasis
- II.I.12.xii.- Distribución geográfica
- II.I.12.xiii.- Características diferenciales de las amibas
- II.I.12.xiv.- Ciclo biológico de E. histolytica en el hombre (Invasividad)

## CAPITULO III.- PARTE EXPERIMENTAL Y METODOS

III.I.1.- Obtención del antígeno	46
III.I.2.- Producción de anticuerpos	50
III.I.3.- Demostración de anticuerpos	50
III.I.4.- Titulación de anticuerpos	51
III.I.5.- Purificación del anticuerpo	54
III.2.- Inmunofluorescencia Indirecta	57
III.3.- Microscopía electrónica	59
III.3.1.- Conjugación de la enzima con la proteína	60
III.3.2.- Actividad de la peroxidasa	62
III.3.3.- Reacción de la Anti-IgG con- jugada a la enzima con las cé- lulas	63
III.3.4.- Preparación de las células para la observación en el - microscopio electrónico	65
III.3.4.a.- Fijación	66
III.3.4.b.- Revelado de la enzima	67
III.3.4.c.- Fijación con $OsO_4$	67
III.3.4.d.- Deshidratación	68
III.3.4.e.- Infiltración	69
III.3.4.f.- Inclusión	70
III.3.4.g.- Cortado de secciones	70
III.3.4.h.- Contrasteación	71

## III.3.5.- Figuras

III.3.5.i.- Técnica de extracción -  
del antígeno

III.3.5.ii.- Esquema de inmunización  
de la LPFG en el conejo

III.3.5.iii.- Relación entre la con  
centración de antisuero es  
pecífico y el porcentaje -  
de una cant. constante de-  
complemento de cobayo

III.3.5.iv.- Esquema de la inmuno -  
fluorescencia indirecta

III.3.5.v.- Esquema de la reacción-  
de la peroxidasa

III.3.5.vi.- Revelado de la enzima

## CAPITULO IV.- RESULTADOS Y OBSERVACIONES

79

## IV.2.- Figuras

IV.2.1.- Determinación del espacio  
vacío de una columna de -  
Ultrogel AcA 22

IV.2.ii.- Elusión del marcador ca-  
talasa

IV.2.iii.- Elusión del antígeno

IV.2.iv.- Composición de la LPFG

IV.2.v.- Espectro de la cromatogra  
fía en fase gaseosa de la LPFG  
(Porción glucosídica)

IV.2.vi.- Purificación de la IgG -  
anti-LPFG

- IV.2.vii.- Purificación de IgGCN
- IV.2.viii.- Doble inmunodifusión -  
Radial (Ouchterlony)
- IV.2.ix.- Contrainmunolectroforesis
- IV.2.x.- Microtitulación de anti -  
cuerpos
- IV.2.xi.- Titulación del complement  
to de cobayo
- IV.2.xii.- Det. del espacio vacío-  
de una columna de Ultrogel  
AcA 34
- IV.2.xiii.- Elusión del conjugado-  
IgG anti-LPFG-HRPO
- IV.2.xiv.- Factor RZ del conjugado
- IV.2.xv.- Propiedades inmunoquími-  
cas del conjugado
- IV.2.xvi.- Concentraciones de los-  
sueros y antisueros utiliz  
ados
- IV.2.vii.- a la IV.2.xxiii.- Inmu-  
nofluorescencia indirecta
- IV.2.xxiv.- y IV.2.xxv.- Microscopía  
electrónica

CAPITULO V.- CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS 108

CAPITULO VI.- APENDICE

VI.I.1.- Abreviaturas 111

	Pág.
VI.I.2.- Material y Reactivos	113
CAPITULO VII.- BIBLIOGRAFIA	125

I.1.- ANTECEDENTES



Los antecedentes que motivaron a efectuar la presente investigación se encuentran en dos trabajos publicados previamente los cuales tuvieron como objetivo la purificación de antígenos polisacarídicos de superficie de trofozoítos de Entamoeba histolytica de la cepa HK-9 cultivados en medio axénico (1,2,3,7).

En un primer intento se extrajeron polisacáridos de acuerdo al método de Freeman-Staub (4,5), éstos reaccionaron con los sueros de conejos inmunizados con trofozoítos de Entamoeba histolytica de la misma cepa HK-9 de donde se obtuvo la molécula, pero en ningún caso con los sueros de pacientes con diagnóstico de amibiasis intestinal y absceso hepático amibiano (3).

Ante éstos resultados se decidió cambiar la técnica de extracción y en ésta ocasión se utilizó la de fenol-agua (6) con lo que se obtuvo la lipopéptidofosfoglicana la cual resultó inmunogénica para los conejos y reaccionó con sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano (8).

Con todos éstos resultados se procedió a estudiar la probable localización de ésta lipopéptidofosfoglicana en los trofozoítos, y los resultados que se encontraron son el objetivo principal de ésta tesis.

## I.2.- O B J E T I V O S

1.- Extracción de una lipopéptidofosfoglicana por la técnica del fenol-agua de trofozoítos de Entamoeba histolytica de la cepa HK-9 cultivados en medio axénico.

2.- Localización de la lipopéptidofosfoglicana en los trofozoítos de Entamoeba histolytica por Inmunofluore -- scencia Indirecta y Microscopía electrónica utilizando Anti-IgG de conejo conjugada a Isotiocianato de Fluoresceína y a la enzima peroxidasa de rábano, respectivamente.

3.- Estudio preeliminar en pacientes con diagnósti co de absceso hepático amibiano, utilizando la molécula ex-- traída, por contrainmunolectroforesis como un método de diag nóstico.

**CAPITULO II.- G E N E R A L I D A D E S**

Los Protozoos ó protozoarios derivan su nombre del griego PROTOS, primero, y ZOOS, animal. La mayoría de ellos son microscópicos y adaptados a vivir en el agua, líquidos orgánicos ó medios húmedos (96). Su medio de locomoción consiste en pseudópodos, flagelos, pestañas vibrátiles, aunque algunos de ellos son móviles en una sólo fase de su ciclo de vida (97). Su sistema de reproducción es altamente sencillo la que se puede realizar por esciparidad, gemación, esquizogonia ó por esporogonia. Su respiración puede ser a través de la membrana plasmática (organismos aerobios), ó bien, tomando el oxígeno por desintegración de materias orgánicas complejas en el interior de las células (organismos aerobios) (98,99,100).

### II.I.1.- CLASIFICACION

La taxonomía de los protozoarios es compleja y no hay un esquema único de clasificación. La división del Phylum Protozoa en cuatro Phyla y un pequeño grupo de afinidad incierta proporciona un buen método simplificado para incluir las especies que parasitan al hombre (101)(Figs.No.1,2,3)

Los protozoarios que pertenecen a la clase Sarcodina (Hertwig y Lesser, 1879) subclase Rhizópoda son organismos que viven libres en la naturaleza ó adaptados a un parasitismo obligatorio. Su cuerpo en estado de reposo es redon-

do u oval pero sufre deformaciones, a veces bruscas, por la emisión de prolongaciones citoplasmáticas denominadas pseudópodos.

Dentro de los Rhizópodos existen varios órdenes, - dentro de los cuales destaca el orden Amoebina (Amebinos) - por la importante patología humana que producen, así como su distribución geográfica mundial (101 a 107). A éste orden -- pertenecen las amibas agrupadas en cuatro géneros importantes; los cuales se diferencian entre sí considerando las características anatómicas como son: cromatina nuclear, endosomas, y principalmente el número de núcleos (108,109).

#### ENTAMOEBIA ( Casagrandi y Barbagallo, 1895 )

Las amibas que parasitan al hombre son de talla -- microscópica, la que presenta mayor tamaño sólo llega a tener 60 micras. Su forma es cambiante por lo que se le dá el nombre de amiba (del griego: *ἀνοιβή*, cambio). Su membrana es delgada la cual no se distinguió en las primeras observaciones efectuadas por Lösch et. al. en 1875. Presentan un citoplasma bien definido, siendo una parte hialina en la periferia (ectoplasma) y otra granulosa en la parte media y central (endoplasma) (25,110,115).

En el endoplasma puede haber vacuolas, eritrocitos (en su forma hematófaga) y, sobre todo en algunas fases de su desarrollo evolutivo, material de reserva en forma de glucógeno. Presentan además unos corpúsculos, que por ser afines a-

los colorantes se han denominado cromidios ó cuerpos cromatoides, los cuales son complejos asociados del RNA-proteína (11,112,113).

Sus núcleos son esferoidales y vesiculosos con gránulos de cromatina, una membrana nuclear, hilos de linina y un endosoma de tamaño, forma y estructura variables (Fig. No. 5). (113).

Estas amibas pueden presentarse bajo diferentes formas correspondientes a las diversas fases dentro de su ciclo evolutivo: 1).- como trofozoítos ó formas vegetativas en la cual presentan su máxima actividad para su desplazamiento y captación de alimento; 2).- forma prequistica, en la cual el trofozoíto empieza a transformarse recubriéndose de una capa gruesa y principia a concentrar su material de reserva en forma de glucógeno y 3).- quiste, bajo la cual la amiba resiste, hasta ciertos límites, la acción de diversos factores físicos y químicos, los cuales, en su fase vegetativa, no resistiría. Esta última corresponde a la forma de diseminación de la amiba (114) (Fig.No. 4).

Este género está caracterizado por tener el núcleo con una corona periférica de cromatina y un cariosoma central ó excéntrico.

En el organismo humano se han citado como parásitos ó comensales algunas especies de éste género, y dentro de éstas destaca la Entamoeba histolytica ya que es la responsable de la mayoría de las infecciones intestinales en el hombre, así como la distribución geográfica que representa, por lo que en adelante sólo me referiré a ella.

## II.I.2.- DATOS HISTORICOS

Desde el año de 1859 había sido señalada por Lambl et. al. en las observaciones de productos tomados de pacientes con disentería. Lewis et. al. en 1870 describió en heces de pacientes enfermos de cólera lo que él describió como leucocitos pero sospechó que se trataba de algún parásito en su forma infectante.

Lösch et. al. en 1875 (*Amoeba coli*) descubren en un paciente con disentería crónica amibas vivas, tanto en las ulceraciones del intestino como en las mucosidades sanguinolentas de heces, pudiendo lograr una inoculación positiva en perro.

Grassi et. al. en 1880 descubrieron quistes de 8 núcleos junto a las formas vegetativas, lo mismo en pacientes sanos que en los pacientes disentéricos, por lo que dudaron del papel patógeno de las amibas.

En 1903, Schaudin et. al. fueron quienes hicieron la diferenciación entre los dos tipos de amibas hasta entonces observadas: E. coli no patógena y E. histolytica patógena, haciendo la observación del porqué existían pacientes enfermos y no enfermos en los que se detectaban las amibas; además, la nomenclatura de E. histolytica fué propuesta.

Kartulis et. al. en 1887 observaron la presencia de amibas en los abscesos hepáticos y H. Vincent en 1909 la existencia de "portadores sanos".



### II.I.3.- DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Esta especie es cosmopolita. Se distribuye con mayor frecuencia y facilidad en pobladores de zonas tropicales, en quienes se encuentra en una prevalencia del 20 % ó más, mientras que en los individuos de zonas templadas ó frías se encuentra del 1.5 al 10 % (142,143).

En México, Beltrán la encontró en un porcentaje del 5 - al 30 % en pacientes hospitalizados, de donde se tuvo la experiencia de que de cada 10 abscesos hepáticos 9 son de etiología amibiana, un 27 % son pacientes con diarreas amibianas y que un 19 % de la consulta gastroenterológica es por amibiasis (144 a la 149) (Fig.No.12).

### II.I.4.- MORFOLOGIA

Entamoeba histolytica presenta dos fases: 1).- Fase vegetativa ó de trofozoíto y otra 2).- quística ó de quiste. (Fig.No.6).

1).- FASE VEGETATIVA O DE TROFOZOITO.- Durante ésta fase puede encontrársela bajo dos formas: a).- una que es la que se encuentra en pacientes con disentería en estado agudo y que recibe los nombres de patógena, hematófaga, histolítica ó tetrágona; y otra b).- la que se encuentra en los enfermos convalecientes ó portadores, recibiendo ésta forma el nombre de minuta (116).

a).- Forma histolítica.- Las dimensiones de la forma histolítica son aproximadamente de 20-30 micras de diámetro (40 micras como máximo). Su ectoplasma está bien diferenciado del endoplasma, en el cual se pueden encontrar hematíes, por ésta circunstancia se le llama forma hematófaga. Presenta un endosoma pequeño y central (117).

b).- Forma minuta.- La forma minuta es más pequeña que la histolítica, mide aproximadamente de 15 a 25 micras de diámetro. Su motilidad es escasa, el núcleo no se visualiza con facilidad y su endoplasma presenta vacuolas nutritivas.

2.- FASE QUISTICA ó DE QUISTE.- Esta fase corresponde a la forma bajo la cual la amiba se disemina. Los quistes de E. histolytica miden aproximadamente de 10 a 14 micras de diámetro. Presenta una capa visible y 4 núcleos que se observan con gran facilidad en preparaciones en fresco y teñidas con hematoxilina férrica (119).

#### II.I.5.- HABITAT

Entamoeba histolytica es un parásito obligatorio del hombre. Se localiza en la luz del colon, y en sus paredes, se encuentra en forma abundante en el ciego, en la parte inicial del colon ascendente y en el recto. También se le puede encontrar en la parte terminal de íleon y apéndice (120); además, puede parasitar tejidos como el hígado, pulmón, cerebro y la piel (121,122).

Un caracter fisiológico muy importante, propio de la especie, es que elabora enzimas proteolíticas las cuales le -- permiten penetrar en los tejidos, en los que se pone en contacto, desintegrándolos (123,125). De esto depende, primordialmente, su patogenicidad. Esta amiba resiste poco los cambios de ambiente; fuera del cuerpo degenera rápidamente su estructura, se inmoviliza y muere en corto tiempo (124).

#### II.I.6.- CICLO EVOLUTIVO

Entamoeba histolytica puede presentar dos ciclos de desarrollo y reproducción: 1).- un ciclo normal ó no patógeno, y otro 2).- anormal ó patógeno (132,133) (Fig.No.7).

1).- CICLO NORMAL ó NO PATOGENO.- El principio de este ciclo se considera en las formas minuta, las cuales se multiplican por bipartición en la superficie de la masa intestinal, y, al cabo de cierta cantidad de divisiones, se convierte en lo que se denomina forma de prequiste (134,135).

2).- CICLO ANORMAL ó PATOGENO.- En el intestino, bajo la acción de factores intercurrentes como las enfermedades, cambios de régimen alimenticio y otros, la forma minuta se transforma en histolitica, multiplicándose activamente por esciparidad. En éste estadio atacan mucosa intestinal y producen los trastornos característicos de las disenterías amibianas (136,137).

Cuando los quistes son expulsados junto con las heces fecales de individuos infectados, puede distribuirse por el medio ambiente y ser ingeridos, con lo cual pasan al estómago de personas sanas a través de alimentos contaminados ó de fomites, en el cual no sufren algún cambio que provoque su muerte, por el contrario, bajo la acción de los jugos intestinales va siendo digerida la capa que lo envuelve y al llegar a la parte baja del íleon se rompe y dá origen a una amiba cuadrinucleada la cual se divide por bipartición originando cuatro amibas uninucleadas (138,139). A ésta fase se le denomina metaquística ó de metaquiste.

Las amibas uninucleadas resultantes se dividen por bipartición, en lo cual, de cada quiste resultan ocho amibas en la fase metaquística, las que pasan al colon, y se fijan en la mucosa, penetran al espesor de ésta donde se alimentan desarrollan y multiplican (140). Si las condiciones de este medio no le son propicias, se mantienen sobre la mucosa intestinal y pronto pasan a la fase prequística y finalmente se transforman en quistes, los cuales son expulsados al exterior junto con las materias fecales y permanecen latentes hasta que inician nuevamente su ciclo en un hospedero adecuado (141)(Fig.No.14).

#### II.I.7.- PAPEL PATOGENO

Se entiende por amibiasis la infección por Entamoeba histolytica (Schaudin,1903), incluyendo los casos de infección en la luz intestinal, ó amibiasis luminal, y los casos,

en que la amiba invade un tejido, se produce amibiasis tisular, de igual manera, se incluye bajo el concepto de amibiasis tanto los casos asintomáticos (portadores sanos) como los que presentan enfermedades clínicas dado que la presencia de la sintomatología es circunstancial y cambiante a lo largo de la infección (9,10,11).

Desde el punto de vista clínico, la amibiasis se puede presentar:

- a).- como una infección asintomática
- b).- con diversos cuadros clínicos intestinales que se pueden dividir en agudos y crónicos
- c).- con cuadros clínicos referidos a patología hepática pudiendo presentarse hepatitis ó absceso hepático amibiano
- d).- como una amibiasis cutánea
- e).- ocasionalmente con manifestaciones clínicas de las diversas complicaciones (12,13,20,21).

En la práctica diaria es frecuentemente difícil, y a veces imposible, decidir en cual etapa se encuentra una infección por Entamoeba histolytica, además, si un paciente en un momento dado presenta sólo amibiasis tisular la cual puede estar ó no acompañada de un cuadro clínico, dificulta el diagnóstico por la falta de sintomatología franca que determine el padecimiento (14 a la 18).

Siendo difícil la diferenciación entre infección y enfer

medad, se prefiere llamar "amibiasis" a todo el conjunto de manifestaciones del estado de la relación hospedero-parásito en un paciente dado en el momento del estudio (19).

Cuatro características son relevantes para el estudio de la relación parásito-hospedero para poder entender su papel patógeno: la presencia de una infección, seropositividad, invasión de tejidos y morbilidad (150).

También, se ha tomado en consideración la presencia ó ausencia de enzimas amibianas, la interacción de éstas enzimas con el hospedero, y el papel que desempeñan las bacterias existentes en el área y la zona que invade el parásito (151,170).

Con respecto al papel patógeno que desempeña Entamoeba histolytica, Maegraith (152), Biagi y Beltrán (153,154), --- Neal (155,156), Haningberg (157) y Bos (158) presentan argumentos al respecto como son: patogenicidad, virulencia y la invasividad.

La patogenicidad es definida por Mægraith (152) como la habilidad del parásito para producir una enfermedad en el hospedero, la virulencia la define como la habilidad del parásito para producir una enfermedad clínica (159).

Neal sostiene que las amibas son normalmente avirulentas en el lumen del intestino, lo cual se vé respaldado por la presencia de portadores sanos, aunque por razones no conocidas se pueden transformar en virulentas (156).

Esta línea de razonamiento, también postulada en otros-

trabajos, ha estimulado la investigación y caracterización de éstos factores desconocidos.

La seropositividad implica la producción de anticuerpos con títulos altos. La morbilidad denota el paso del parásito a los tejidos, lo cual es suficiente para producir una lesión macroscópica (150).

La gran mayoría de los individuos con infección por Entamoeba histolytica son portadores asintomáticos. Los casos clínicos van desde una diarrea moderada hasta una disentería aguda con eliminación de moco y sangre, debilidad extrema, y en algunos casos, la muerte (161).

Una población variable de individuos con disentería amibiana presentan abscesos necróticos del hígado, ó una hepatitis generalizada de etiología amibiana, donde los abscesos se encuentran libres de bacterias los cuales pueden contaminarse secundariamente, debido a la existencia de otros tipos de bacterias las que se asientan en el mismo lugar del absceso, además de que la defensa local no es lo suficientemente eficiente para poder evitarlo (162,163).

Toda la cuestión de la relación hospedero-parásito en la amibiasis, incluyendo la producción de la enfermedad, es compleja (164,165,166); también complica el cuadro la falta de un acuerdo, incluso en bases morfológicas, del diagnóstico y de las especies que pueden producir la amibiasis (108,167,168).

Las diferentes cepas de la especie varían en su morfología y patogenicidad al hombre (169,170). Algunas la pierden-

rápidamente en cultivo, y las patógenas al hombre pueden no-serlo para los animales de laboratorio (172,173).

Algunos investigadores han presentado argumentos indicando que la patogenicidad de las amibas están relacionadas directamente con las bacterias que se asocian a ellas, lo cual se vé apoyado, en parte, por los ensayos hechos en cobayos libres de bacterias donde la incapacidad de la amiba para producir lesiones extensas apoyan la idea de que es indispensable una acción bacteriana sinérgica en la amibiasis (174,-175,176).

Sin embargo, se han encontrado abscesos hepáticos amibianos estériles, (177,178) con lo cual se han hecho ensayos para relacionar la capacidad invasora de las cepas con la presencia ó ausencia de actividad proteásica ó mucopolisacáridica (125) donde ésta es debida a la acción de diversas enzimas como la glutaminasa (179), caseasa (180), ribonucleasa (181), succinildeshidrogenasa (182), fosfomonoestereasa (183) hialuronidasa (184), amilasa, maltasa (185), estereasa (186) y gelatinasa (187,188).

Seguramente falta conocer mejor el cuadro enzimático de E. histolytica, y asimismo, determinar cuáles de éstas son utilizadas por la amiba en su superficie y hacia su exterior (125).

Cuando los trofozoítos invaden los tejidos, lo hacen mediante movimientos activos orientados en una misma dirección y ayudándose con las enzimas que elaboran. Las amibas invaden todo el espesor de la mucosa y atraviesan después la "muscularis mucosae" y llegan hasta la capa fibrosa submucosa en la que proliferan debido a su consistencia laxa (189,-



### II.I.8.- CULTIVO

Entamoeba histolytica puede cultivarse en varios medios de desarrollo líquidos que permiten su crecimiento como son el de Boeck y Dbrohlav (202) antiguamente usado, que consiste en una preparación de huevo en solución de Löcke y suero sanguíneo ó albúmina bovina, al cual se le agrega almidón de arroz (125,126).

Actualmente para su cultivo, se utiliza el medio axénico ó monoaxénico los cuales consisten en caldos enriquecidos donde conjuntamente se puede hacer el cultivo de bacterias, monoaxénico, ó libres de ellas, axénico (127 a la 131).

### II.I.9.- INMUNIDAD

No hay pruebas directas de que exista inmunidad adquirida por la infección de E. histolytica. La reacción con anticuerpos séricos contra la infección se demuestra por la reacción de la fijación del complemento que es positiva en más de un 80 % de los individuos infectados. El suero de las personas infectadas puede inhibir, en grado diverso, la capacidad de las amibas cultivadas para ingerir eritrocitos ó inmovilizarlos (195).

Los anticuerpos de los individuos infectados marcados con fluoresceína tienen una especificidad considerable para las especies infecciosas y cierto grado de especificidad de cepa (196,197).

En escala microscópica también los inmunoprecipitados - en sistemas de difusión en geles, demuestran cierta especificidad de especie; de igual forma, se ha creado una muestra - de una prueba de diagnóstico empleando una técnica de hemaglutinación indirecta (198,199,200,201).

La relevancia de la respuesta inmune ante E.histolytica en algunos investigadores, no representa un problema aunque observen en forma experimental y clínicamente el que el protozoo invada los tejidos y cause reacciones inmunitarias - las cuales no son aún muy claras ya que bajo los planteamientos científicos básicos de la inmunología, la respuesta inmunitaria que se tiene para éste parásito no corresponde a los resultados esperados, por lo que la variedad de éstos, las - conclusiones que se tienen al respecto aún en la actualidad, son de gran controversia (40 a la 59).

Los anticuerpos de las clases IgG, IgM, IgA sérica y secretoria pueden ser demostrados mediante hemaglutinación pasiva, reacciones de precipitación (60 a la 71) y anticuerpos conjugados a marcadores como lo son la ferritina, fluoresceína, peroxidasa de rábano, así como las pruebas con Concanavalina A (72 a la 81). No obstante, la presencia de anticuerpos específicos no indica necesariamente la infección activa, sino que señala la exposición del hospedero en algún tiempo al parásito (12,27,33,82,83).

Las pruebas cutáneas proporcionan respuestas inmediatas en algunos enfermos, indicando la producción de anticuerpos de la clase IgE (84). Hasta la fecha no existen buenas evidencias, aunque existen trabajos publicados que afirman que las

inmunoglobulinas confieren alguna protección (85 a la 88).

La inmunidad mediada por células contra los antígenos - de E. histolytica puede ser medida por pruebas cutáneas las- cuales producen una reacción de hipersensibilidad retardada- en muchos enfermos a los cuales no se les manifiesta una sin tomatología franca del padecimiento (89 a la 93).

Una evidencia reciente indica que los enfermos con pade- cimiento hepático amibiano tienen deprimida la inmunidad me- diada por células contra los antígenos amibianos, aunque re- tienen su capacidad para responder a otros antígenos en prue- bas cutáneas (94,95).

Se sostiene el hecho de que al establecer contacto el - parásito con el hospedero en el que se establece y principal- mente en la zona que se sitúa, el estímulo que el hospedero- reciba es debido en gran medida a su zona externa, es decir, en la amibiasis, si las formas infectantes de E. histolytica- penetran, la zona responsable del estímulo antigénico se debe al contacto con su membrana, y ésta, al estar compuesta de- una diversidad de moléculas, de menor ó mayor tamaño, traerá consigo que la mayoría de ellas sean inmunogénicas (11,22 a- la 28), dependiendo de su posible colocación y situación así como de su complejidad química, tamaño y conformación en la- membrana producirá que se induzca una respuesta inmune (29 a la 35).

#### II.I.10.- DIAGNOSTICO

El diagnóstico de padecimientos provocados por E. histo

lytica consiste en la búsqueda, fundamentalmente, y el hallazgo de los organismos característicos-en heces (CPS), así como una diferenciación morfológica de entre las demás amibas-no patógenas (comensales) que se encuentran en las deyecciones humanas. Se ha utilizado con poca frecuencia el cultivarla, ya que E.coli que se encuentra como población normal intestinal hace a veces imposible el diagnóstico, ya que en cultivo es similar (171,203,204). En preparaciones directas de heces diarreicas frescas en solución isotónica a 37°C puede-revelar las formas ameboides activas, éstas también pueden encontrarse en las muestras tomadas directamente de lesiones del intestino grueso mediante proctoscopio (141). La coloración M.I.F. de Sapero, Lawless y Strome es útil para preparaciones temporales, aunque la mejor diferenciación la proporcionan los frotis fijados y teñidos con hematoxilina férrica (119). En las evacuaciones formadas pueden encontrarse quistes que se identifican fácilmente con soluciones yodadas como la de D'Antoni (167). El método de concentración con formol-éter de Ritchie y el M.I.F. de Blagg et.al. (167), tanto para quistes como para trofozoítos, son excelentes en el diagnóstico de infecciones leves que pueden pasar inadvertidas - por el exámen directo (168).

Actualmente se han desarrollado técnicas inmunológicas-muy útiles para el diagnóstico de la amibiasis invasora. Los métodos son específicos pero de sensibilidad diversa ya que los anticuerpos persisten por periodos variables de tiempo - después de terminada la infección, éstas técnicas serológicas no son adecuadas para el diagnóstico de la infección activa. Algunos de los métodos, como el de aglutinación en lá-

tex, son relativamente rápidos y sencillos, aunque debido a lo anterior, la sensibilidad puede verse disminuída, ya que si se trata de una infección en la cual el paciente sólo es un portador sano, no se podrá determinar exactamente su padecimiento debido a los niveles séricos de anticuerpos y además, como se mencionó anteriormente, éstos no persisten por un tiempo prolongado. Por otra parte, éste método de diagnóstico sólo es efectivo, en la mayoría de las veces, en una amibiasis de tipo invasivo por la estimulación antigénica directa que ejerce el parásito hacia su hospedero ( 205 a la - 210).

#### II.I.11.- QUIMIOTERAPIA

Para normar la conducta terapéutica, es fundamental valorar a cada paciente de acuerdo a un criterio anatomoclínico de clasificación de acuerdo a la localización y el grado de invasión.

En los pacientes con amibiasis intestinal crónica, y desde luego en los asintomáticos, la principal población de amibas se encuentra en la luz intestinal por lo que los medicamentos más adecuados son los que destruyen los trofozoítos a éste nivel. Es importante hacer notar que es erróneo hablar de fármacos que destruyan quistes, ya que éstos al formarse son eliminados y no desempeñan un papel en la infección del hospedero, sino en la transmisión, y dado que la infección se mantiene por el número de trofozoítos viables.

En la amibiasis hepática se han recomendado diversos -

fármacos para destruir los trofozoítos ubicados en el parénquima hepático. Cuando los abscesos han tenido una evolución prolongada, el resultado terapéutico es menos favorable, y se supone que ésto es debido a la escasa permeabilidad del absceso (217) (Fig.No.9).

Phylum:  
PROTOZOA

Subphylum:

PLASMODRAMA  
(Doflein, 1901)

- con organelos de locomoción ó sin ellos, núcleos de un un sólo tipo

Clase: SARCODINA

trofozoitos con pseudopodos

Clase: MASTIGOPHORA

trofozoitos con flagelos

Clase: SPOROZOA

sin órganos de locomoción

producen esporas

parásitos obligados

Subphylum:

CILIOPHORA  
(Doflein, 1901)

- con cilios núcleos de dos tipos de vida libre

CLASE: CILIATA

ciliados

FIG.No. 1 .- Cuadro de clasificación del Phylum Protozoa ( Protozoarios ).  
( Barnes., D.R.: Zoología de los Invertebrados. 2a Ed. Ed. Interamericana. pp. 5 - 55 )

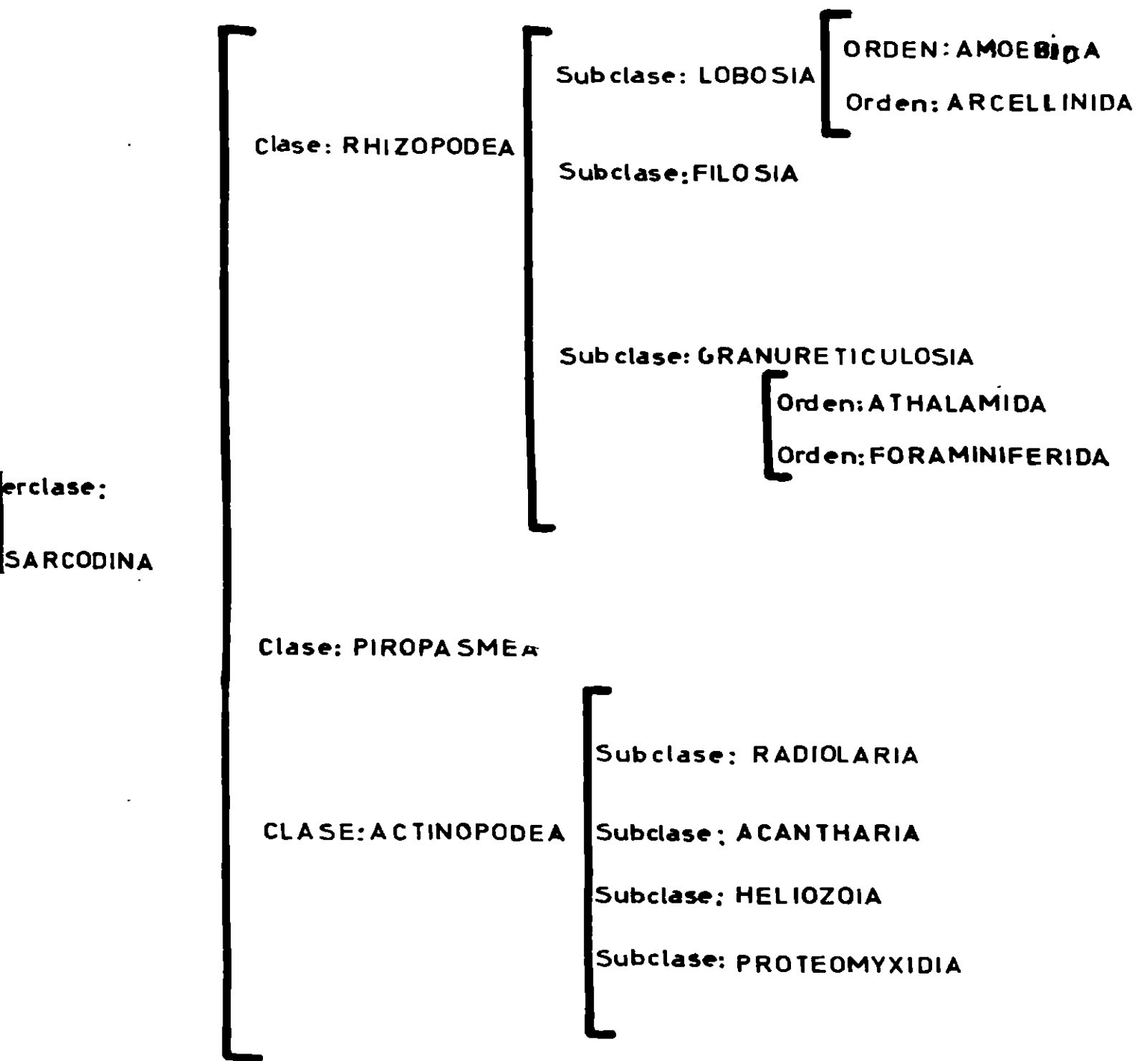


FIG. No. 2 .. Clasificación de la  
 superclase Sarcodina. ( Barnes., D.R. : Zoología  
 de los Invertebrados. 2a Ed. Ed. Interamericana. pp. 5-55)



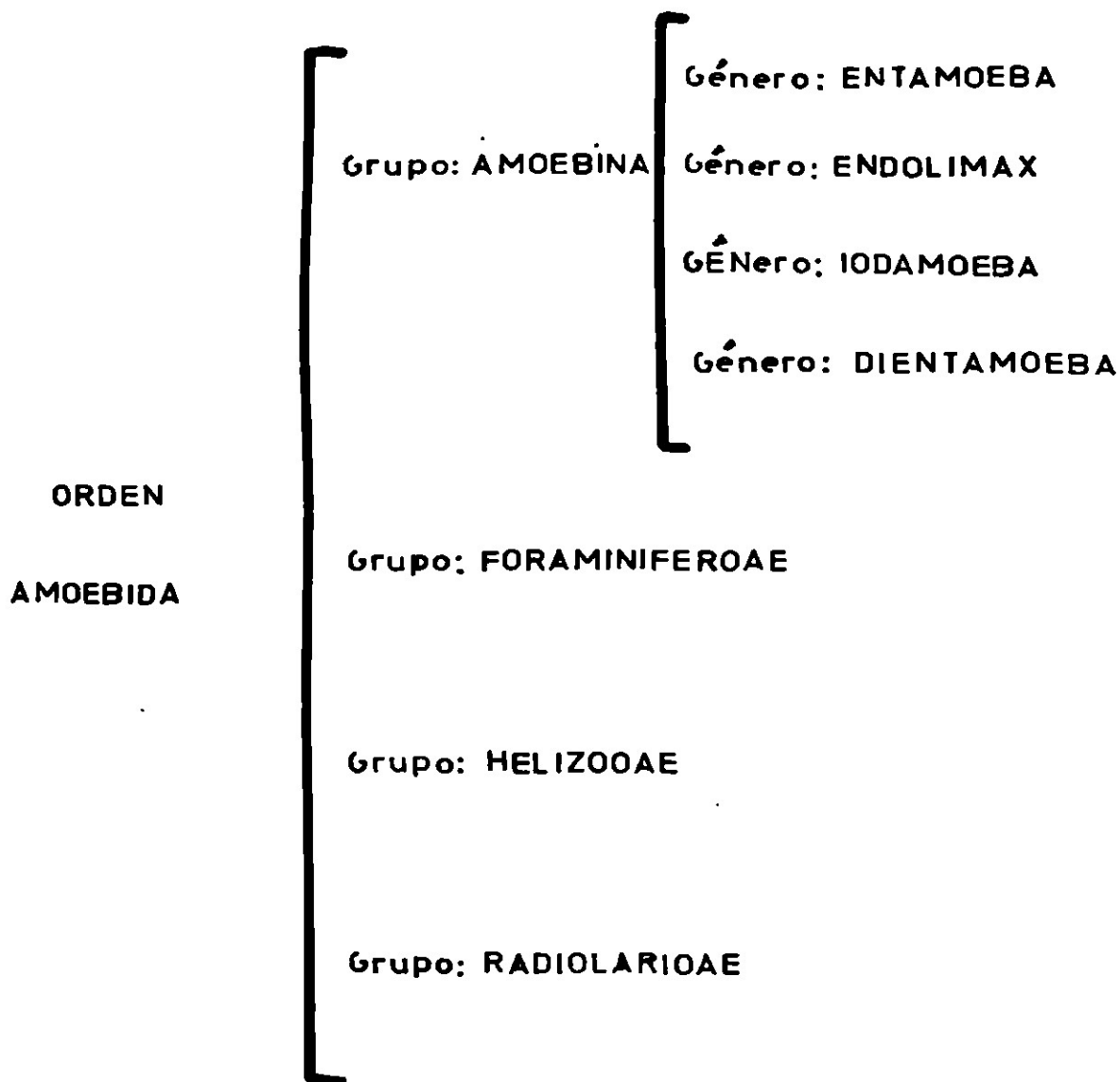


FIG. No. 3 .- Cuadro de clasificación del orden Amoebida. (Barnes., D.R. : Zoología de los Invertebrados., 2a Ed., Ed. Interamericana. pp. 5 - 55)

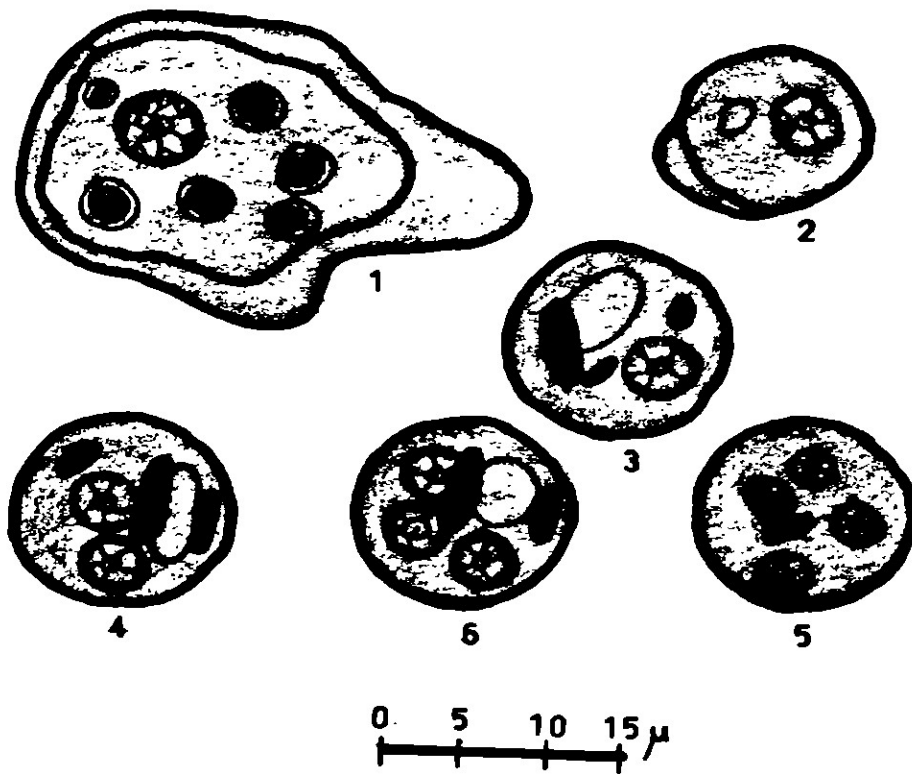


FIG. N<sup>o</sup>.4 .- Entamoeba histolytica

1.- Trofozoito 2.- Prequiste 3,4,5,6.- Quistes

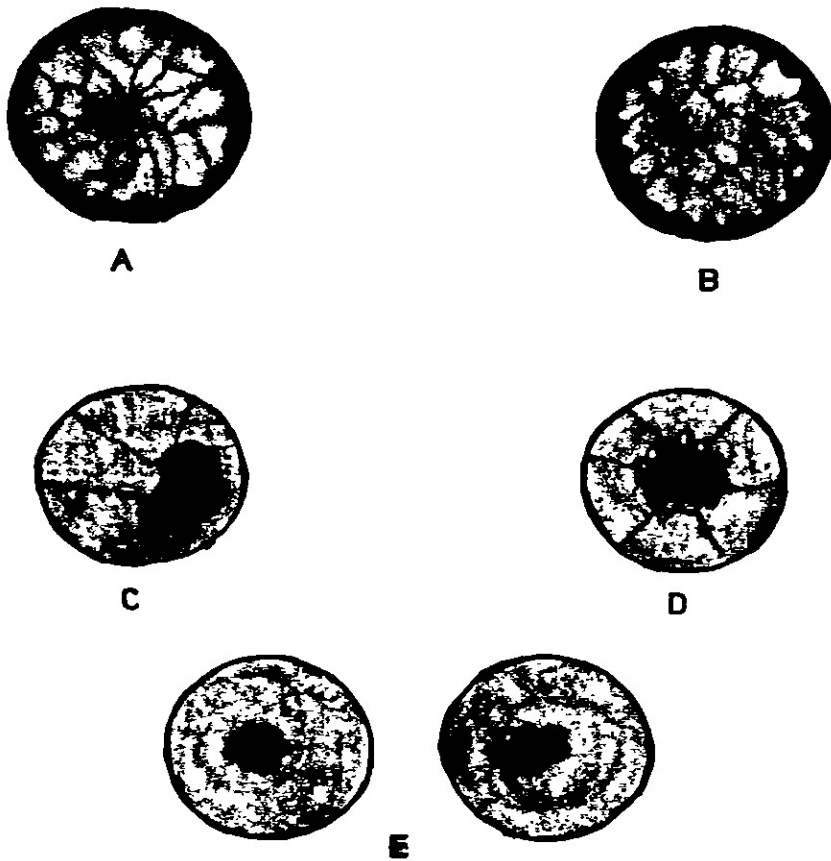
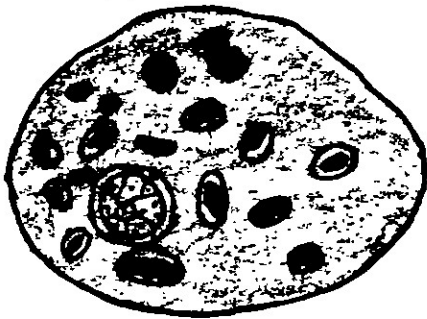
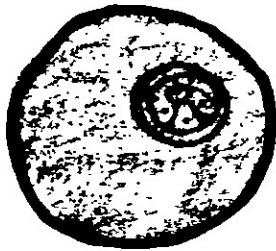


FIG. No. 5.- Núcleos de las amebas humanas. A.-*E. histolytica* ; B.- *E. coli* ; C.- *E. nana*; D.- *I. butschlii*; E.- *D. fragilis*.

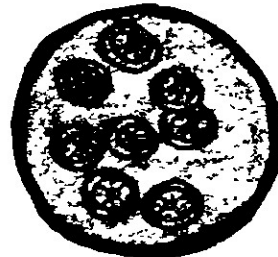
E. coli



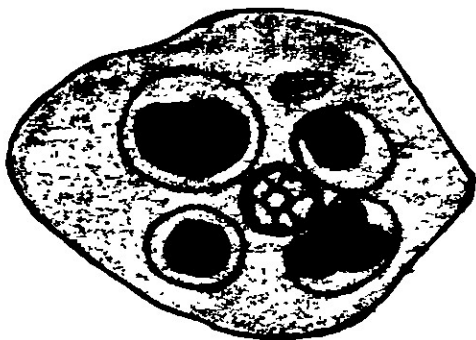
TROFOZOÍTO



PREQUISTE

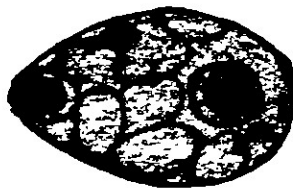


QUISTE

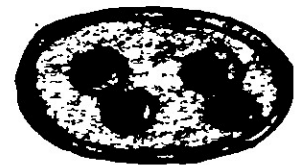


E. gingivalis

E. nana

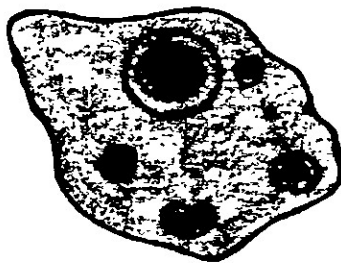


TROFOZOÍTO



QUISTE

butschlii

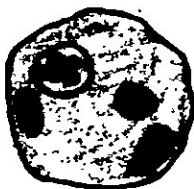


TROFOZOÍTO



QUISTE

D. fragilis



TROFOZOÍTOS

FIG. No. 6 .-Otras amibas parásitas del hombre.

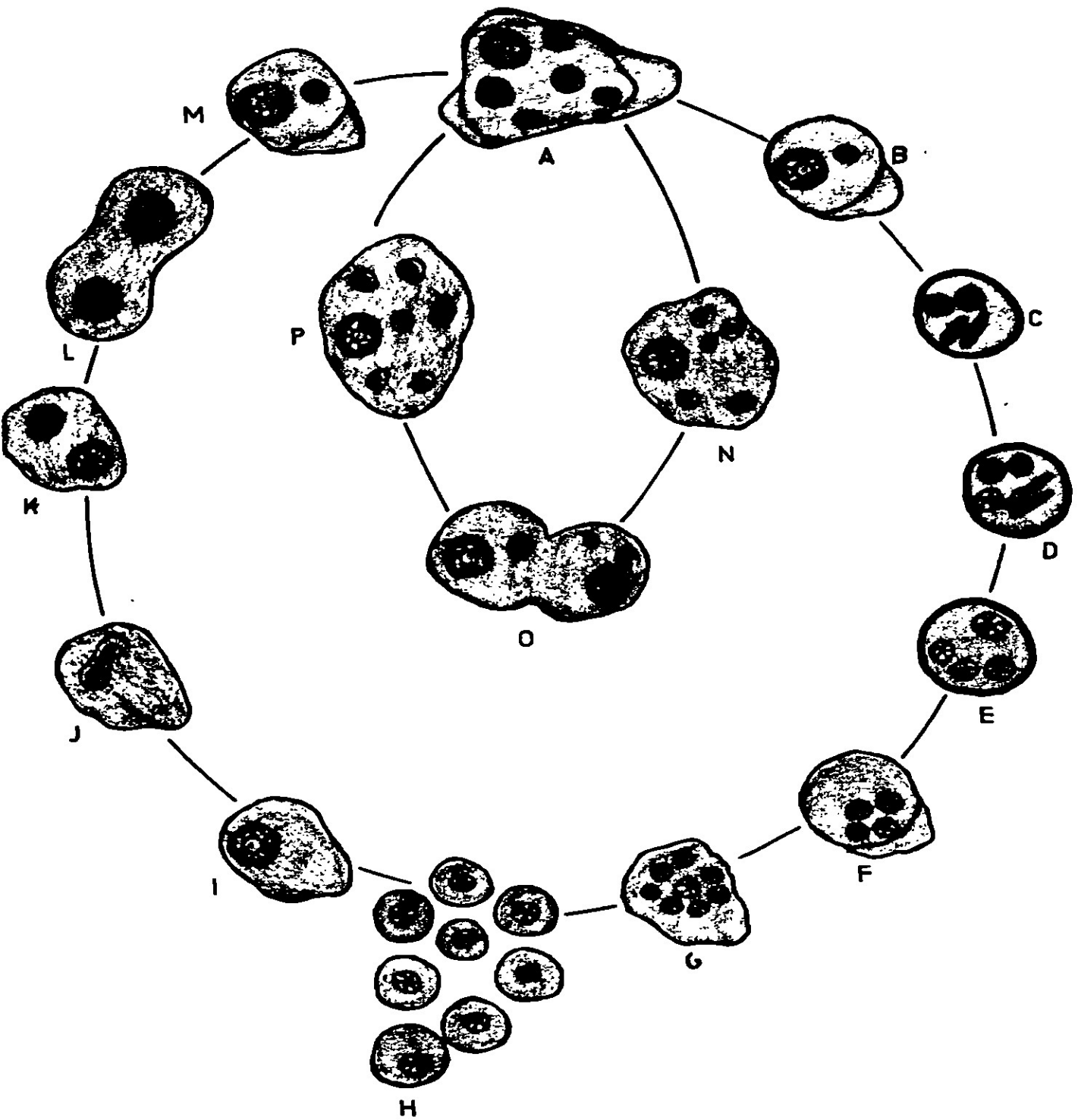


FIG. NO. 7 .. Entamoeba histolytica, Ciclo vital

( según Brumpt ) A-M: Ciclo no patógeno correspondientes a las formas minuta ; N, O y P ciclo de la forma histolítica-patógena.

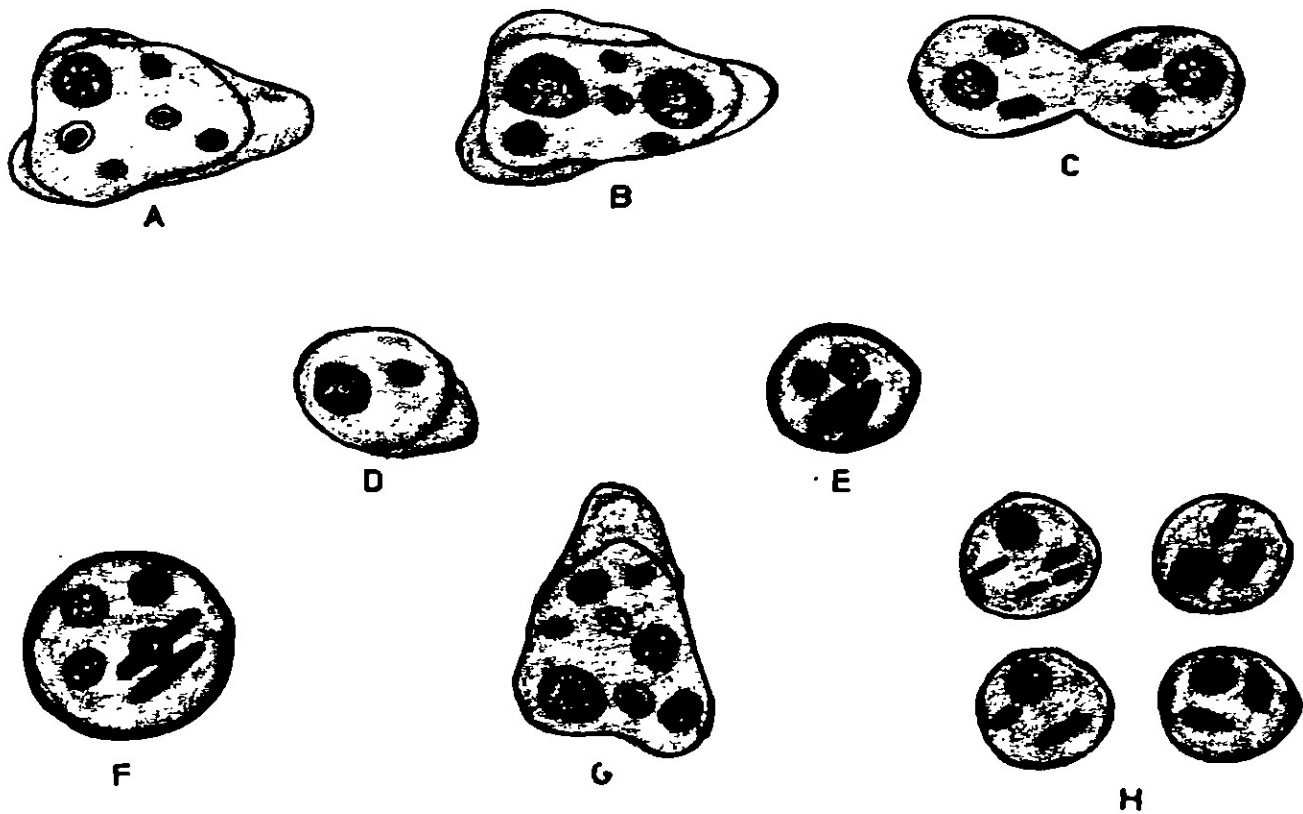


FIG.No.8 .. Ciclo vital de Entamoeba -  
histolytica A.-Trofozoíto. B.- División del núcleo. -  
 C.- División del citoplasma. D.-Prequiste .E.-División  
 del núcleo en el quiste en formación. F.- Quiste ma-  
 duro. G.- Metaquiste. H.- Amibas postquísticas.

MEDICAMENTOS Y CONCENTRACION AMEBICIDA (µgrs/ml )		OXIQUINOLEINAS	ARSENICALES	EMETINAS	CLOROQUININAS	IMIDAZOLES	DICLOROACETAMIDAS
LOCALIZACION DEL PARASITO	TIPO CLINICO DE AMIBIASIS	8	8	3	300	3	0.04 0.60
LUZ INTESTINAL	PORTADOR	X	X				X
PARED INTESTINAL	ASINTOMATICA	X	X				X
	INTEST. CRONICA	X	X			X	X
	INTEST. AGUDA			X		X	X
	AMEBOMA			X		X	X
HIGADO	HEPATITIS AGUDA			X	X	X	
	AMIBIANA						
	ABSC. HEPATICO AMIBIANO			X	X	X	
OTRAS	DIVERSAS LOCALI- ZACIONES VISCERALES			X		X	
	CUTANEA			X		X	

FIG.No. 9 .- Espectro de acción antiamebiana  
de diversos medicamentos.  
Litter.M.: Trat.Farmacol. Ed Atheneo S.A.

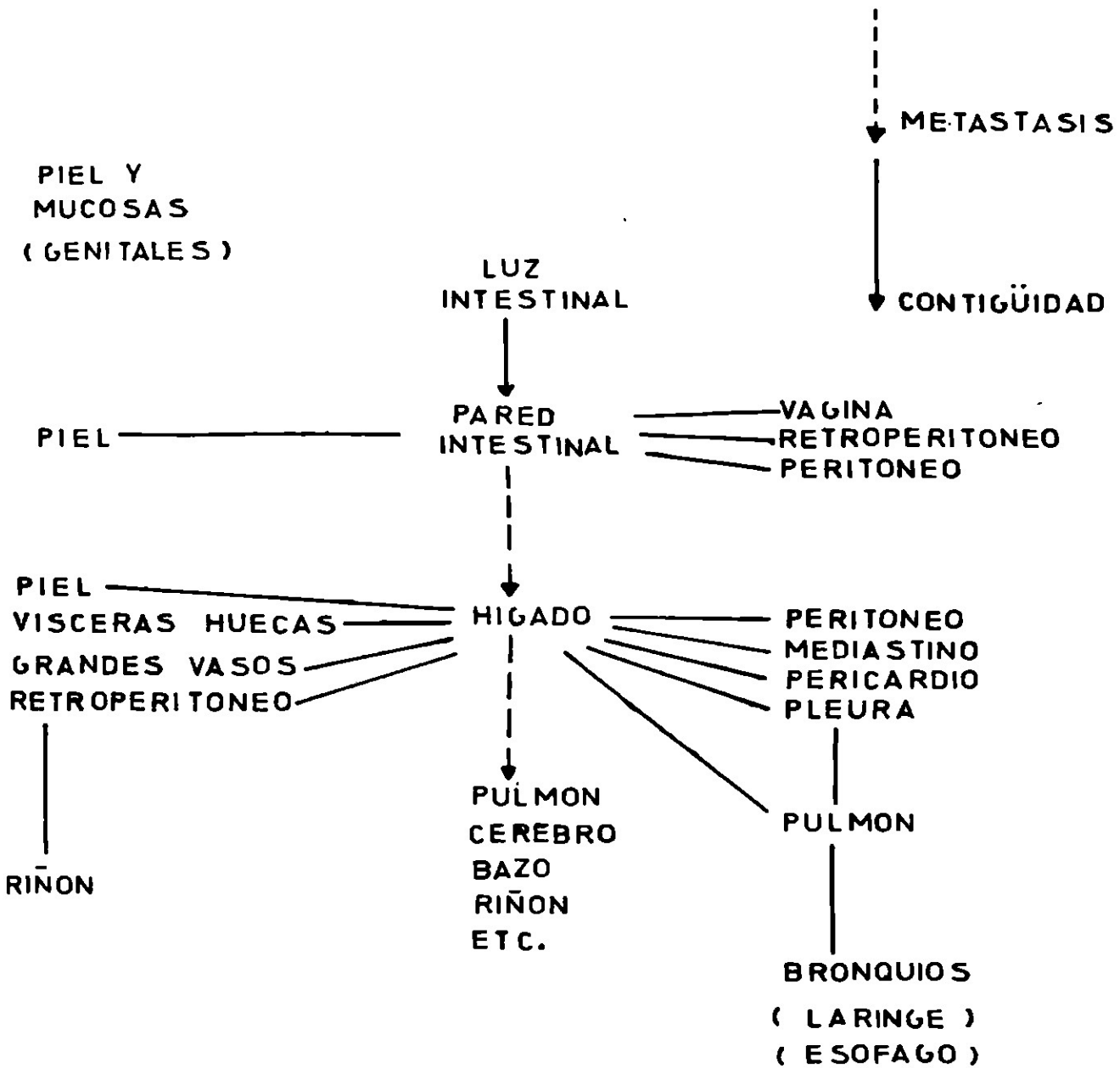


FIG.No.10.- Esquema de las posibilidades de migración de Entamoeba histolytica en el hombre.

Gac. Méd. Méx. 97:69,1967



LOCALIZACION DEL PARASITO	TIPO CLINICO DE AMIBIASIS	CPS	REACCION SEROLOGICA	TIPOS DE AMIBIASIS	
COLONIZACION DE LA LUZ INTESTINAL	PORTADOR	+	-	LUMI - NAL	INTESTINAL
INVASION DE LA PARED INTESTINAL	ASINTOMATICA AMEBOMA INTESTINAL CRO- NICA O AGUDA	+	+	TISULAR	
INVASION DEL HIGADO	HEPAT. AGUDA ABSC. HEPATICO	-	+		EXTRAINTEST.
INVASION DE TE- JIDOS Y OTROS ORGANOS	CUTANEA DIVERSAS LOC. VISCERALES	-	+		

FIG.No.11 .. Correlación entre las distintas etapas de la migración de Entamoeba histolítica en el hombre y los diversos cuadros clínicos de la amibiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1(4):540,1965

LOCALIZACIÓN	FRECUENCIA (%)
ZONAS TEMPLADAS <sub>1</sub>	20 %
ZONAS FRÍAS <sub>1</sub>	1.5 - 10 %
PACIENTES HOSPITALIZADOS	30 %
PORTADORES SANOS ASINTOMÁTICOS	27 %
CONSULTA GASTROENTEROLÓGICA	19 %
DIARREAS AMIBIANAS	4 - 12 %
ABSCESOS HEPÁTICOS	9 %

FIG-NO. 12.— Distribución de padecimientos causados por E. histolytica en México. Proc. 7° Internat. Trop. Med.

Mararia 2: 268, 1964

	Entamoeba histolytica	Entamoeba coli	Entamoeba gingivalis	Endolimax nana	Iodamoeba butschlii	Dientamoeba fragilis
Trofozoítos						
Tamaño	20-60 $\mu$	15-50 $\mu$	6-35 $\mu$	6-12 $\mu$	9-20 $\mu$	3-12 $\mu$
Ectoplasma	bien diferenciados	poco diferenciados	bien diferenciados	no siempre diferenciados	no diferenciados	bien diferenciados
Endoplasma						
Hemañes	Si	No	A veces	No	No	No
Bacterias	No	Si	Si	Si	Si	Si
Pseudópodos (a 20-25°C)	Form. rápida, largos, hialinos	Form. lenta, cortos, granulosos.	Form. rápida, hialinos	Cortos, anchos, hialinos, F.R.	Cortos, amplios, hialinos, F.L.	Amplios, hialinos form. rápida.
Motilidad (a 20-25°C)	Muy activa	Débil	Activa	Muy poca	Muy poca	Activa
Núcleo (en fresco)	Periférico	Subcentral	Visible	Poco visible	Invisible	Invisible
Núcleo (coloreado)	Membrana delgada. Cromatina periférica en granos.	Membrana gruesa. Cromatina periférica densa.	Membrana delgada. Cromatina periférica fina.	Membrana media. Sin cromatina periférica.	Membrana gruesa. Sin cromatina periférica.	Doble. Membrana muy fina. Sin cromatina periférica.
Cariosoma	Pequeño y central	Mediano y excéntrico	Pequeño y central	Voluminoso y excéntrico	Voluminoso y central	Central. De varios gránulos
Quistes						
Tamaño	10 a 14 $\mu$	15 a 30 $\mu$	no se conocen	8 a 10 $\mu$	5 a 18 $\mu$	no se conocen
Inclusiones siderófilas	Gruesas, extremos redondos	Delgadas irregulares	* Esféricas ó baciliformes	*	Vacuola iodófila	
Contorno	Sencillo	Doble				
Núcleos	4	8		4	1	1

FIG. No. 13 ..CARACTERES DIFERENCIALES DE LAS AMIBAS

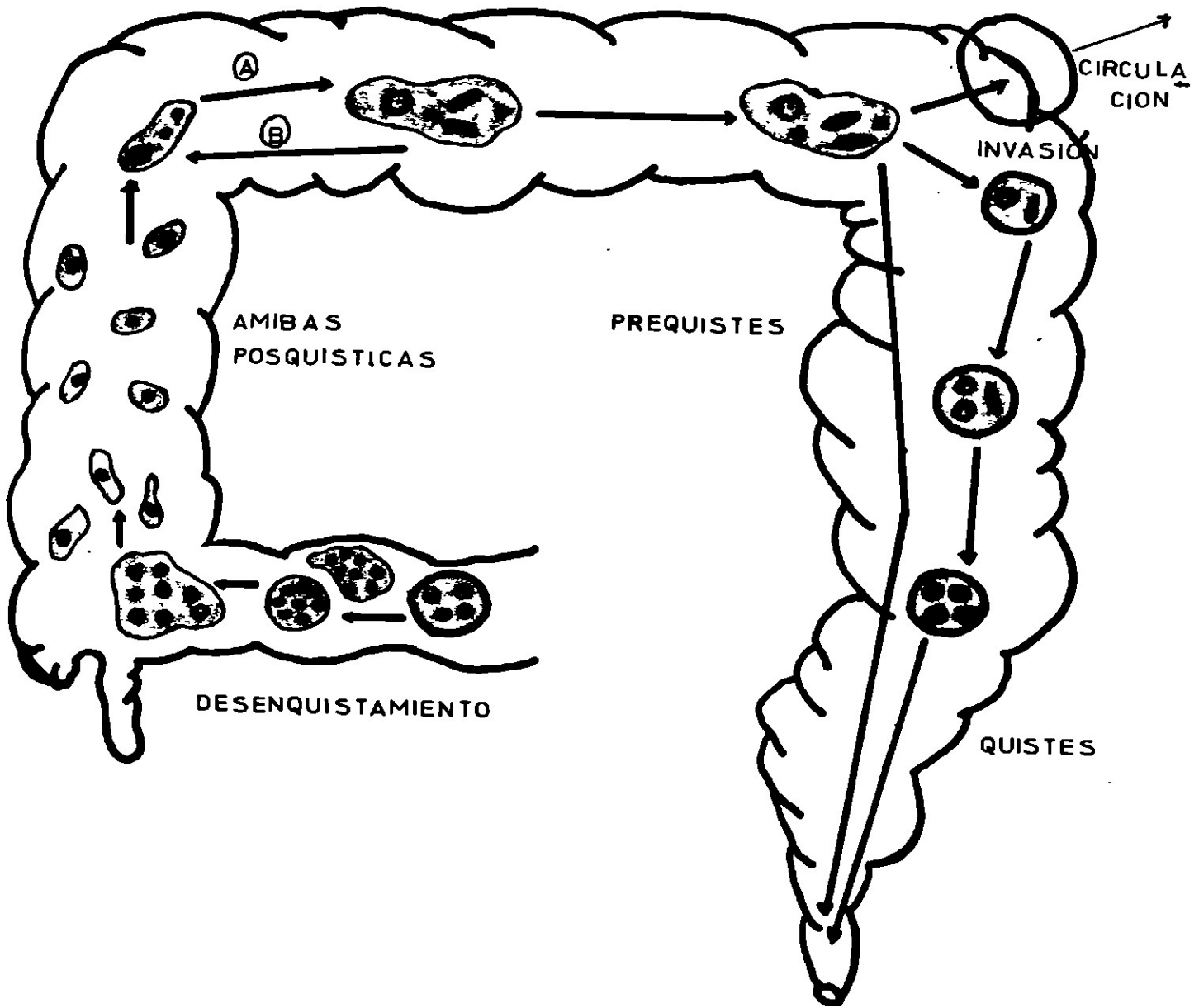


FIG. NO. 14 .- CICLO BIOLÓGICO DE  
Entamoeba histolytica

CAPITULO III.- P A R T E E X P E R I M E N T A L  
Y M E T O D O S

Para efectuar la investigación del antígeno extraído de los trofozoítos de Entamoeba histolytica de la cepa HK-9 cultivados en medio axénico, se procedió de acuerdo al siguiente protocolo:

I).- Cultivo de los trofozoítos en el medio axénico -- TYI-S-33 descrito por Diamond (127)

II).- Obtención del antígeno por la técnica del fenol-a-gua (Westphal-Lüderitz) (6)

III).- Producción de anticuerpos por inmunización en -- conejos.

IV).- Búsqueda de anticuerpos

i).- CIEF

ii).- Ouchterlony

V).- Titulación de anticuerpos

i).- Hemaglutinación pasiva (201)

ii).- Hemólisis pasiva

VI).- Purificación de anticuerpos

i).- Concentración de anticuerpos por precipitación salina.

ii).- Cromatografía en columna sobre DEAE-celulo-

VII).- Inmunofluorescencia Indirecta (75)

VIII).- Microscopía Electrónica (78)

### III.I.1.- OBTENCION DEL ANTIGENO

Se extrajo una lipopéptidofosfoglicana de trofozoítos de Entamoeba histolytica de la cepa HK-9 por la técnica del fenol-agua(6) cultivados en medio axénico TYI-S-33 de acuerdo a la técnica descrita por Diamond (127). Los trofozoítos fueron recolectados del medio de cultivo por centrifugación a 1500 rpm durante 30 min y lavados posteriormente con solución salina isotónica estéril y a un pH fisiológico a modo de eliminar sustancias adheridas a su membrana provenientes del medio de cultivo líquido. Una vez lavadas, las células fueron suspendidas en una solución de fenol al 45 % durante 10 min a 65°C; seguido a esto, se enfrió la suspensión obtenida a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3000 rpm durante 45 min, con lo que se obtuvo una fase acuosa y otra -- fenólica insoluble, fueron separadas éstas dos fases y a la insoluble se le efectuó una segunda extracción fenólica a -- las mismas condiciones. Las dos fases acuosas obtenidas de -- ésta manera se mezclaron y dializaron contra agua destilada por espacio de 48 hrs efectuando de 8 a 10 cambios con la finalidad de eliminar totalmente el fenol del producto así obtenido.

Posterior a esto, se centrifugó a 5000 rpm durante 40 min y el sobrenadante se concentró en rotavapor a una temperatura de 40°C.

El concentrado se centrifugó a 3000 rpm por espacio de 10 min y se tomó nuevamente el sobrenadante centrifugándolo nuevamente, pero ésta vez a 33000 rpm por un tiempo de dos horas con lo que se obtuvieron un botón y un sobrenadante. -



El sobrenadante se desechó y el botón fué disuelto en agua - destilada y se liofilizó. Finalmente, el producto así obtenido guardó en congelación a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  para -- efectuar ensayos de pureza (Fig.No.15).

Los ensayos de pureza que se efectuaron al antígeno extraído consistieron en electroforesis en gel de poliacrilamida con lo cual se pudo saber que la pureza del antígeno así-separado resultó ser bastante aceptable, ya que sólo se observó una sólo banda de corrimiento después de procesada la-placa del polímero.

Se trató de determinar el peso molecular del antígeno - por medio de cromatografía en columna utilizando una matriz-de Ultrogel AcA 22 comparando el tiempo de elusión del antígeno con un marcador de peso molecular alto como es la catalasa , la cual tiene un peso molecular de 210,000 daltons.

Primeramente se determinó el volumen vacío de una columna de 90 x 0.5 cm utilizando azul dextrana de peso molecular 2000 daltons y eluyendo con regulador de fosfatos 0.01 M pH-7.6 recogiendo fracciones de 2 ml cada una. Este azul dextrana eluido se le efectuó análisis espectrofotométrico a 254 nm de longitud de onda con lo cual se obtuvo el espacio vacío - de la columna. Este espacio vacío fué de 11 ml (Fig.No.22).-- Posteriormente, al eluir el antígeno, con el mismo regulador, y determinado por el método de la antrona, éste empezó a -- eluir a un volumen de 12 ml (Fig.No.24).

La catalasa utilizada como marcador de peso molecular - eluyó a un volumen de 32 ml. Esta última fué determinada por el método de Lowry efectuando análisis espectrofotométrico -

a 280 nm de densidad óptica (Fig.No.23).

De igual forma, se le efectuaron análisis inmunológicos al antígeno extraído por medio de cromatografía en fase gaseosa de alta presión obteniéndose resultados que demuestran que aproximadamente el 85 % de la molécula está constituida de azúcares, de presentar una porción lipídica del 2-3 %, la cual no está bien caracterizada si es parte integral de la molécula ó no, así como una pequeña cantidad de fósforo del 1-2 %.

Con tales resultados se pudo deducir que la molécula referida es una lipopéptidofosfoglicana.

Para investigar la probable localización de ésta molécula en los trofozoítos, se procedió de la siguiente manera:

I).- Inoculación de conejos con la lipopéptidofosfoglicana

II).- Búsqueda de anticuerpos por:

a).- Doble inmunodifusión en geles de agarosa ( -  
( Ouchterlony )

b).- Contraimmunoelectroforesis (CIEF)

III).- Titulación de anticuerpos

i).- Hemólisis pasiva

ii).- Hemaglutinación

IV).- Estudio de 17 sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano.

a).- Contrainmunolectroforesis

b).- Hemólisis pasiva .

c).- Hemaglutinación

V).- Inmunofluorescencia Indirecta

VI).- Microscopía electrónica (Anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa de rábano).

### III.I.2.- PRODUCCION DE ANTICUERPOS

Los anticuerpos contra la lipopéptidofosfoglicana fue - ron obtenidos por inoculación en conejos Nueva Zelandia de - aproximadamente 2 Kgrs de peso, inoculando por vía subcutá-- nea 2 mgrs del producto obtenido en adyuvante incompleto de Freund. Dos semanas más tarde fueron nuevamente inoculados - con la mitad de la primera dosis (1 mgr) en adyuvante incompleto de Freund. Este mismo esquema se repitió dos veces inoculando cada semana. El conejo fué sangrado 10 días después de la última inoculación (Fig.No.16).

Antes de iniciar el tratamiento de inmunización, el conejo se sangró y se obtuvo suero normal el cual fué utilizado como control.

### III.I.3.- DEMOSTRACION DE ANTICUERPOS

Una vez concluido el esquema de inoculación, se proce-- dió a la búsqueda de anticuerpos antilipopéptidofosfoglicana producidos. Para ésto se aplicó la técnica de la doble inu-- nodifusión (Ouchterlony) utilizándose el antígeno antilipo - péptidofosfoglicana (PS) en solución salina estéril en una - concentración de 100 mgrs/ml, suero total de conejo normal - ( $Ac_2$ ), suero total del conejo inmunizado ( $Ac_1$ ), suero del co nejo previo a la inmunización ( $Ac_3$ ), así como solución salina como controles (salina), y efectuada de la manera siguien te: se preparó una solución de agarosa en solución regulado-- ra de barbituratos. Esta solución fué aplicada en una placa-

y se le permitió solidificarse. Posteriormente, se le hicieron 5 pozos mediante una placa de cortado y se aplicó con la ayuda de capilares los diferentes antisueros. La placa se dejó en cámara húmeda por 24 hrs para permitir la difusión de los sueros.

Posteriormente, la placa se lavó con agua destilada 12-hrs a 37°C para eliminar el exceso de sueros y fué teñida -- con una solución de Amido-Negro (Amido de Schwarz) y decolorada con una solución de ácido acético al 10 % efectuando tres cambios. Una vez decolorada, se secó en una estufa de esterilización de calor seco a 37°C cubierta con papel secante Watman del No. 1.

Una vez hecho ésto, se pudo observar una banda de precipitación entre los pozos que contenían el suero del conejo inmunizado (Ac<sub>1</sub>) y la lipopéptidofosfoglicana (PS), con lo que se pudo confirmar la producción de anticuerpos específicos (Fig. NO. 29).

#### III.I.4.- TITULACION DE ANTICUERPOS

El título de los anticuerpos fué obtenido por hemólisis pasiva: primeramente se sensibilizaron y estandarizaron glóbulos rojos de carnero al 1 %.

La titulación se llevó a cabo en placas de titulación de la manera siguiente: el suero del conejo antilipopéptidofosfoglicana fué absorbido con glóbulos rojos de carnero normal para eliminar anticuerpos específicos, y de complementado. Se

guido a ésto se colocó en diluciones seriadas en solución de Veronal más calcio y magnesio con un pH de 7.4, y a cada dilución le fueron agregados 50 microlitros de la suspensión de glóbulos rojos de carnero estandarizados y sensibilizados con la lipopéptidofosfoglicana y 50 microlitros de suero de cobayo (complemento), previamente titulado (Fig.No.32), para permitir la activación de la vía alterna del complemento, en una dilución de 1:5. Se agitó la placa para formar una mezcla homogénea de los productos agregados y ésto fué incubado a 37°C por una hora, con lo cual se pudo saber hasta que pozo de las series consideradas existió lisis (Fig.No.31).

Los productos que fueron empleados y agregados son los siguientes:

A).- GRCN + STCI absorbido con GRCN sin complemento ( - control negativo)

B).- GRCS + STCI absorbido con GRCN sin complemento - (control negativo).

C).- GRCN + SCN absorbido con GRCN + complemento ab sorbido con GRCN (control negativo)

D).- y E).- GRCS + IgG anti-LPPG + complemento ab - sorbido con GRCN

F).- y G).- GRCS + SCT anti-LPPG absorbido con GRCN - + complemento de cobayo absorbido con GRCN

H).- GRCS + solución salina estéril + complemento - absorbido con GRCN (control negativo)

Para la estandarización y sensibilización de los glóbulos rojos de carnero normal se utilizó la técnica utilizada normalmente por el equipo de trabajo, efectuada de la siguiente manera: se lavaron glóbulos rojos de carnero normal tres veces con solución salina isotónica estéril hasta que el sobrenadante quedó libre de hemoglobina. Posteriormente se efectuaron dos lavados con solución salina-fosfatos reguladora (PBS) pH 7.4. Seguido a esto, se tomaron 200 microlitros del paquete de eritrocitos y fueron suspendidos en 4 ml de la solución reguladora, a ésta suspensión se le agregaron 2 mgrs/ml de la lipopéptidofosfoglicana. Los glóbulos rojos de carnero se dejaron sensibilizar 30 min a 30°C. Transcurrido éste tiempo de incubación, se lavaron tres veces con solución reguladora de fosfatos-salina para eliminar el exceso de antígeno que no se adhirió a la membrana de los eritrocitos. Finalmente, el paquete de eritrocitos obtenido mediante centrifugación a 1500 rpm se suspendió en 40 ml de una solución reguladora de Veronal más calcio y magnesio pH 7.4. La suspensión obtenida finalmente contiene eritrocitos de carnero normal sensibilizados contra la lipopéptidofosfoglicana en una concentración del 1 %.

Una vez demostrada la producción de anticuerpos se procedió a demostrar la localización del antígeno en los trofozoítos de Entamoeba histolytica. Para esto fueron utilizadas dos técnicas inmunológicas: Inmunofluorescencia Indirecta y la Microscopía electrónica utilizando anti-IgG de conejo producida en cabra con fluoresceína y peroxidasa de rábano, respectivamente.

Para poder realizar éstas dos técnicas, primeramente tuvo que ser purificado el anticuerpo.

### III.I.5.- PURIFICACION DEL ANTICUERPO

Para la purificación del anticuerpo se utilizó la técnica de Garvey et.al. (213), la cual es una precipitación de - proteínas por la acción de una sal. La sal que se utilizó es el sulfato de amonio. La técnica consiste en una extracción- de gammaglobulinas del suero a partir del cual se precipitan mediante una solución saturada de sulfato de amonio a un pH- de 7.8, pH óptimo de precipitación, por tres veces a diferentes concentraciones: dos de 50 % y la tercera al 33 %.

Esta precipitación de la gammaglobulina se llevó a ca--bo de la siguiente manera: se ajustó el pH de una solución - saturada de sulfato de amonio a 7.8 por la adición de NaOH - 2 N. En un matríz erlenmeyer de 5 ml se colocó 1.0 ml de suero de conejo inmunizado; con agitación se agregó 1.0 ml de - la solución saturada de sulfato de amonio. La agitación fué- mantenida por tres minutos y la suspensión resultante se --- centrifugó a 1400 x g (3000 rpm) durante 30 min con lo que - se obtuvieron un precipitado opalescente y un sobrenadante - claro. El sobrenadante fué desechado y el precipitado se regeneró a su volúmen original con solución salina isotónica ( - 1 ml) en la cual se solubilizó y se procedió a efectuar una-- segunda precipitación al 50 %. El resultado de ésta precipi- tación, que se hace al 50 %, es el de que precipite la --



IgG de conejo antilipopéptidofosfoglicana además de otras proteínas, otras globulinas y trazas de albúmina.

Finalmente, se efectuó una tercera precipitación al 33 %, es decir, al volúmen del producto obtenida de las precipitaciones al 50 % le fueron agregados 0.49 ml de la solución saturada de sulfato de amonio, centrifugándose nuevamente a las mismas condiciones que en las anteriores, y el producto obtenido de ésta tercera precipitación se disolvió en 1.0 ml de una solución reguladora de fosfatos 0.01 M pH 8. Este volúmen se dializó a 4°C contra una solución de fosfatos 0.01 M pH 8 efectuando dos cambios, cada 12 hrs, por tres días.

Cuando la diálisis ha sido completa, la solución se removió de la membrana de diálisis y se centrifugó ésta solución a 1400 x g a 4°C por 30 min para eliminar el material insoluble. Logrado éste producto se procedió a efectuarle una segunda purificación mediante cromatografía en columna. La matriz que se utilizó fué DEAE-celulosa la cual es un intercambiador iónico débilmente básico, la cual permitió separar y obtener pura la inmunoglobulina G anti-LPPG.

Para ésta separación se tuvo que activar previamente la celulosa; es decir, ionizar determinados puntos de la molécula de la celulosa lo que permite que, al paso a través de ella, las inmunoglobulinas queden atrapadas de acuerdo a la electronegatividad de cada una, siendo la menor la de la IgG.

Una vez activada, se montó la columna y se eluyó por 24 hrs con solución reguladora de fosfatos 0.01 M pH 8 para estabilizarla y balancearla. Posteriormente fué adicionado el producto crudo obtenido por precipitación, en una proporción

de 30-50 mgrs de proteína por cada gramo de celulosa seca. - La proteína fué eluída con la misma solución reguladora y -- fueron recolectadas fracciones de 2 ml cada una y efectuando seles análisis espectrofotométrico a 280 nm de densidad óptica (Fig.No.27).

Posteriormente se procedió a concentrar las fracciones, en las cuales se encontró la concentración mayor de proteína, a presión haciendo pasar la solución a través de una membrana Amicón XM 100 A la cual no permite el paso de moléculas -- mayores de 100,000 daltons de peso molecular (IgG = 150,000-daltons de peso molecular). La misma técnica fué utilizada -- para purificar IgG normal a partir del suero del conejo previo a la inoculación, para utilizarla como control (Fig.No.-28).

Una vez purificadas la IgG normal y la IgG anti-LPFG -- se procedió a efectuar los ensayos para la localización de -- la molécula en los trofozoítos.

Y como ya se mencionó, se utilizaron dos técnicas de -- marcaje inmunohistoquímico: la Inmunofluorescencia Indirecta y la Inmunoperoxidasa.

### III.2.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Para ésto, se utilizó la técnica de Kagan et.al.(214)-- modificada por Nakane et.al.(77).

Fueron utilizados trofozoítos de Entamoeba histolytica cultivados en medio axénico TYI-S-33, i).- suero total de -- conejo normal, ii).- suero del conejo previo a la inmunización, iii).- suero de conejo total antilipopéptidofosfoglicana, iv).- IgG normal, v).- IgG anti-LPFG y vi).- suero de ca bra anti-IgG de conejo conjugada a isotiocianato de fluoresceína (comercial).

El experimento se llevó a cabo de la manera siguiente:

Se tomó un lote de trofozoítos de ,72 hrs de cultivo -- (fase logarítmica de crecimiento) y fué lavado 10 veces con solución salina isotónica centrifugando después de cada lavado a 1500 rpm durante 10 min. Posterior al último lavado fueron contados el número de trofozoítos obtenidos mediante la técnica de conteo de glóbulos blancos, en una cámara de Neubauer. La población viable obtenida mediante ésta técnica -- fué de aproximadamente  $10 \times 10^6$  trofozoítos. Después de contados, fueron ajustados a  $5 \times 10^6$  trofozoítos/ml de solución salina isotónica estéril.

Mediante la ayuda de una asa de platino fueron colocados en laminillas de vidrio desengrasadas. Se permitió, una vez aplicada la muestra, que la solución salina evaporara al medio ambiente y fueron fijadas cada una de las preparaciones con alcohol absoluto durante 45 min. Las laminillas fueron -

sacadas del baño fijador y fueron lavadas con solución salina y después con una solución reguladora de fosfatos-salina pH-7.2 y se les permitió el secado al medio ambiente.

Posteriormente, con la ayuda de capilares, se les aplicó a cuatro de ellas los sueros siguientes: a).- suero total de conejo normal; b).- IgG normal de conejo; c).- suero total de conejo anti-LPPG y d).- IgG de conejo anti-LPPG. Fue utilizada una quinta placa a la cual se le aplicó solución salina isotónica estéril para ser utilizada como control.

Una vez aplicados los diferentes sueros, fueron colocadas en una cámara húmeda por un tiempo de 30 min para permitir la reacción antígeno-anticuerpo.

Posteriormente, fueron lavadas en una cámara de tinción con solución reguladora fosfatos-salina pH 7.2 por 45 min -- efectuando tres cambios. Las laminillas fueron sacadas de la cámara de lavado y se les permitió el secado al medio ambiente. Una vez secas, y con ayuda de un capilar, se les aplicó a cada una de ellas suero de cabra anti-IgG de conejo marcada con isotiocianato de fluoresceína y fueron colocadas en una cámara húmeda por 30 min.

Concluido éste tiempo, se lavaron con solución reguladora de fosfatos-salina pH 7.2 durante 45 min en una cámara de tinción efectuando tres cambios. Las placas fueron secadas al medio ambiente y se les aplicó una coloración de contraste con azul de Evan al 0.5 % en el mismo regulador.

Una vez teñidas se les dejó secar al medio ambiente y fueron observadas en un microscopio de fluorescencia Univar (Richter, C. Austria).

### III.3.- MICROSCOPIA ELECTRONICA: TECNICA DE LA PEROXIDASA

Los anticuerpos que pueden unirse covalentemente a enzimas pueden utilizarse para demostrar la presencia y localización de antígenos celulares (215 a la 223).

Uno de los marcajes enzimáticos más comunmente usados-- es el de la utilización de la peroxidasa de rábano. Este proceso histoquímico involucra la incubación de la enzima con un sustrato que puede ser oxidado por el peróxido de hidrógeno (224) en presencia de la peroxidasa de rábano, a un pH -- óptimo, el cual debe de ser determinado para cada sustrato -- (219,220,225,226), dependiendo de la sensibilidad y especificidad que se quiera obtener.

Se acepta que el mecanismo de la reacción involucra la formación de radicales libres para producir el enlace con la enzima (227) y se ha propuesto, aunque no es aceptado en forma convincente, que la formación de los radicales libres es a partir de donadores de electrones (228,229).

Para tal fin, la peroxidasa de rábano (HRPO) fué acoplada a una inmunoglobulina de cabra anti-IgG de conejo para -- utilizarla en el marcaje inmunohistoquímico (75).

En contraste con otras técnicas inmunohistoquímicas, -- como la fluoresceína (230), y ferritina (231), la peroxidasa de rábano puede ser usada en microscopía de luz y microscopía electrónica.

Es especialmente útil para la localización intracelular de antígenos, ya que su peso molecular es de 40,000 daltons-- y es considerablemente más pequeña que la ferritina (650,000

daltons de peso molecular). Esta anti-IgG marcada posee propiedades de penetración muy altas.

La peroxidasa de rábano (HRPO) es una glicoproteína con un contenido de carbohidratos de aproximadamente del 18 % (-232). Esta porción glucosídica no se requiere para la activación enzimática, pero sí para producir la acoplación de la anti-IgG de conejo, producida en cabra, mediante la protección por la producción de grupos aldehído por oxidación con metaperyodato de sodio y complementando el bloqueo de los grupos alfa y eta amino remanentes y los grupos hidroxilo con fluorodinitrobenceno (FDNB)(223). Para esto se utilizó la técnica de Nakane et.al.(77) de la manera siguiente:

### III.3.1.- CONJUGACION DE LA ENZIMA CON LA ANTI-IgG DE CONEJO

Cinco miligramos de peroxidasa de rábano (Sigma-HRPO, - tipo IV; RZ aproximadamente 3.0) fueron disueltos en 1.0 ml de una solución reguladora de bicarbonato de sodio 0.3 M con un pH de 8.1 inmediatamente preparada antes de utilizarse. A ésta solución le fué agregado 0.1 ml de fluorodinitrobenceno al 1 % en etanol absoluto y se agitó cuidadosamente por 1 hr a temperatura ambiente. Transcurrido éste tiempo, se le adicionó a la solución 1.0 ml de metaperyodato de sodio 0.04 M en agua destilada y se mantuvo en agitación cuidadosa por 30 min a temperatura ambiente con lo que se obtuvo una solución amarillo-verdosa, a la cual se le egregó 1.0 ml de etilén glicol 0.16 M en agua destilada y se mantuvo en agitación por

una hora a temperatura ambiente.

Transcurrido éste tiempo, a la solución obtenida, la - cual contiene la enzima con los grupos aldehído (Aldehído-HR PO) se colocó en una bolsa de diálisis de colodión, recientemente preparada, y se mantuvo dializando por dos días -- contra una solución reguladora de bicarbonato de sodio 0.01-M pH 9.5 a 4°C y fueron efectuados 5 cambios.

Una vez dializada la solución, se sacó de la bolsa de - diálisis y le fueron agregados 200 microlitros (aproximada - mente 5 mgrs) de un suero de cabra anti-IgG de conejo el cual fué disuelto previamente en 1.0 ml de una solución regulado- ra de bicarbonato de sodio 0.01 M pH 9.5 y se mantuvo en agi- tación por tres horas a la temperatura del laboratorio (25°) permitiéndose que la enzima se enlazara covalentemente a la- inmunoglobulina.

Posteriormente, a la solución le fueron agregados 5 mgrs de borohidruro de sodio y se agitó la solución cuidadosamen- te por 24 hrs a 4°C. La solución resultante fué dializada -- nuevamente contra una solución reguladora de fosfatos-salina pH 7.4 por 24 hrs a 4°C. En éste paso de la técnica se formó un precipitado el cual consistió en el producto de la reac- ción del borohidruro de sodio excedente con el agua de las-- soluciones, el cual fué eliminado por centrifugación de la - solución a 1500 rpm.

Una vez concluido éste procedimiento, la solución se co- locó en una columna de 70 x 1 cm la cual fué montada utili- zando como matriz Ultrogel AcA 34 (equivalente a Sephadex -- G-100) que fué equilibrada previamente con una solución regu- ladora de fosfatos-salina pH 7.2 por 36 hrs y a la cual le -

le fué determinado previamente el espacio vacío con Azul Dextrana 2000 (Fig.No.33).

Una vez colocado el producto en la columna, fué eluído con una solución reguladora de fosfatos-salina pH 7.2 manteniéndose un volúmen de elusión de 30 gotas/min y se recogieron fracciones de 2 ml cada una y efectuándosele análisis espectrofotométrico a cada fracción a 280 nm y 403 nm de densidad óptica (Fig.No.34).

Se mezclaron las muestras eluídas de los tubos nueve al doce(aproximadamente 8 ml) y fueron concentradas a presión - utilizando una membrana Amicón XM 100 A la cual no permite - el paso de moléculas mayores de 100,000 daltons de peso molecular (HRPO-anti IgG conjugadas = 190,000 daltons de peso molecular).

Al producto eluído y concentrado se le efectuaron ensayos de actividad inmunoquímica, tanto para la anti-IgG de conejo como para la enzima (Fig.No.36).

### III.3.2.- ACTIVIDAD DE LA PEROXIDASA

Fueron tomados 20 microlitros del producto concentrado y fueron mezclados con 0.5 ml de p-cresol 14.3 mM en regulador Tris-HCl 50 mM pH 7.4. A ésta mezcla se le adicionó 0.5-ml de peróxido de hidrógeno al 0.02 % en agua destilada preparado inmediatamente antes de utilizarse.

Después de tres minutos, la reacción fué detenida por - la adición de 2.0 ml de cianuro de sodio 3.7 mM en agua destilada con lo cual se inhibió la actividad enzimática y se -



le efectuó análisis espectrofotométrico a 320 nm y 410 nm de densidad óptica. La actividad fué expresada como un porcentaje de la actividad original (Fig.No.36).

### III.3.3.- REACCION DE LA ANTI-IgG MARCADA CON LOS TROFOZOITOS

Como ya se mencionó, para efectuar éste ensayo se utilizó la técnica de Nakane et.al.(77) haciéndole ciertas modificaciones por mi parte.

Para lo anterior fueron utilizados: a).- Trofozoítos de Entamoeba histolytica de la cepa HK-9 cultivados en medio -- axénico TYI-S-33; b).- suero total de conejo normal; c).- suero del conejo normal previo a la inmunización; d).- suero total de conejo anti-LPFG; e).- IgG normal; f).- IgG anti-LPFG y g).- suero de cabra anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa de rábano.

El experimento se llevó a cabo de la manera siguiente:

Los trofozoítos fueron obtenidos de la manera similar -- que en el ensayo de inmunofluorescencia indirecta, obteniéndose un lote de aproximadamente  $10 \times 10^6$  células las cuales fueron ajustadas a  $2 \times 10^6$  células/ml de una solución isotónica.

Tubos de ensayo fueron fueron numerados del 1 al 5 y a cada uno de ellos se les agregaron 2 ml de la suspensión de trofozoítos, lo cual permitió trabajar con  $2 \times 10^6$  trofozoítos en cada ensayo, y a los cuales les fueron agregados en --

éste mismo orden: a).- 150 microlitros de una solución de en zima al 1 % en solución salina isotónica; b).- 150 microli - tros de suero total de conejo previo a la inmunización; c).- 150 microlitros de IgG normal; d).- 150 microlitros de suero total de conejo anti-LPFG, y e).- IgG anti-LPFG. Una vez a-- gregados los diferentes sueros y antisueros, los tubos fue - ron colocados en un baño de agua a 37°C por 30 min.

Transcurrido éste tiempo, fueron sacados del baño de in cubación y fueron centrifugados a 1500 rpm durante 15 min a - fin de obtener el paquete celular y, poder así, eliminar el - sobrenadante. Una vez hecho ésto, los trofozoítos fueron la - vados por tres veces consecutivas con solución salina isotó - nica. Al final del tercer lavado, el paquete celular se sus - pendió en 1.0 ml de solución salina isotónica y les fueron - agregados a cada uno de los diferentes ensayos 150 microli - tros de la solución de la Anti-IgG de conejo conjugada con - la enzima y se incubó nuevamente en baño de agua a 37°C por - un tiempo de 30 min.

Concluído el tiempo de la segunda incubación, los tubos fueron centrifugados por 15 min a 1500 rpm, con lo que fué - eliminado el sobrenadante y el paquete celular fué lavado -- por tres veces con solución salina isotónica.

Después del tercer lavado, el paquete de trofozoítos - fué preparado para la observación al microscópio electrónico.

### III.3.4.- PREPARACION DE LAS CELULAS PARA LA OBSERVACION EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO

Para poder observar los trofozoítos en el microscópio - electrónico, y por lo tanto, la reacción en su membrana, fué utilizada la siguiente técnica:

#### I).- Fijación

- i).- Fijación del paquete celular en glutaraldehído.
- ii).- Postfijación en solución de Karnowsky

#### II).- Revelado de la enzima

- i).- Reacción de la enzima con diaminobencidina (- DAB) en presencia de peróxido de hidrógeno

#### III).- Postfijación de las muestras en tetróxido de osmio

#### IV).- Deshidratación

- i).- Deshidratación con alcohol etílico absoluto-- a diferentes proporciones (ascendente)

#### V).- Infiltración

- i).- Infiltración de cada uno de los ensayos en -- tolueno-resina

#### VI).- Inclusión

- i).- Inclusión en resina Araldita
- ii).- Polimerización de la resina a 60°C

VII).- Cortado de secciones

i).- Hechura de cortes (seccionamiento en microtomo)

ii).- Fijación en rejillas

iii).- Contrastación

VIII).- Observación en el microscopio electrónico

III.3.4.a.- FIJACION

Para fijar las células se utilizó glutaraldehído. A cada uno de los ensayos les fueron agregados 5 ml de glutaraldehído al 3 % en solución reguladora de cacodilato 0.1 M-PH 7.4 y fueron dejadas en éste baño fijador por 24 hrs. Una vez fijadas las preparaciones, fueron lavadas en solución de Karnovsky por 36 hrs.

Una vez transcurrido el tiempo de lavado, los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm por 30 min a fin de obtener el paquete celular, desechándose el sobrenadante claro.

Obtenido el paquete celular de cada ensayo, se procedió a revelar la enzima.

### III.3.4.b.- REACCION DE LA PEROXIDASA (REVELADO)

Para revelar la enzima, primeramente los trofozoítos - fueron suspendidos en 1 ml de una solución reguladora de Tris -HCl 0.05 M pH 7.6. Posteriormente, se hizo reaccionar la enzima con Diaminobencidina como sustrato en presencia de peróxido de hidrógeno de la manera siguiente: el paquete de trofozoítos fueron suspendidos en 1.0 ml de una solución reguladora de Tris-HCl 0.05 M pH 7.6 y les fué agregado 1.0 ml de una solución de diaminobencidina al 0.03 % con peróxido de hidrógeno al 0.025 % en solución reguladora de Tris-HCl 0.05 M pH 7.6 y fueron incubados por 15 min a temperatura ambiente (Fig.No.21).

Una vez transcurrido éste tiempo, cada uno de los tubos fué centrifugado a 1500 rpm para obtener el paquete de trofozoítos, desechándose el sobrenadante y se procedió a postfijarlos.

### III.3.4.c.- POSTFIJACION CON TETROXIDO DE OSMIO

Para efectuar la postfijación de cada paquete celular - con  $OsO_4$ , éste tuvo que ser preparado de la manera siguiente: se utilizó una ampolleta de tetróxido de osmio de 1 gr.- El contenido se colocó en un frasco ámbar y se le agregaron 50 ml de agua destilada. Se dejó en reposo durante toda la noche y posteriormente se agitó lentamente, para permitir la disolución total. Una vez logrado lo anterior, y al cabo de-

36 hrs, se guardó en refrigeración a 4°C. La solución obtenida de ésta manera tiene una concentración del 2 %. Para la utilización en la postfijación se diluyó ésta solución al 1 % v/v en solución reguladora de Tris-HCl 0.05 M pH 7.6.

De la solución anterior, le fué agregado 1 ml a cada uno de los paquetes celulares obtenidos una vez hecha la reacción de revelación y fueron dejadas en éste baño por 24 hrs a 4°C. Pasado éste tiempo se lavaron tres veces con regulador de cocodilato 0.05 M pH 7.6.

Una vez efectuada la postfijación con tetróxido de osmio, se llevó a cabo el tratamiento de deshidratación.

#### III.3.4.d.- DESHIDRATAACION

El mecanismo de deshidratación fué llevado a cabo con alcohol etílico a diferentes porcentajes, partiendo de una concentración del 50 % v/v en solución salina isotónica de la manera siguiente:

El paquete celular de cada uno de los diferentes ensayos realizados fué resuspendido en alcohol etílico al 50 % v/v en solución salina durante 10 min. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 30 min y fueron resuspendidos los paquetes celulares en alcohol al 70 % v/v, posteriormente en alcohol al 80 % efectuando dos cambios y recolectando el paquete celular mediante centrifugación, el paquete celular fué resuspendido inmediatamente después en alcohol al 90 % v/v y, finalmente, en alcohol absoluto por 15 minutos con tres cambios.

En cada cambio de concentración de alcohol, fueron centrifugados cada uno de los tubos a 1500 rpm durante 30 min - y el paquete celular fué resuspendido en el alcohol de la si guiente concentración. Para cada cambio de alcohol fueron -- utilizados 15 ml.

Concluída la deshidratación, se procedió a efectuar la infiltración de las células.

#### III.3.4.e.- INFILTRACION

La infiltración de las células deshidratadas se hizo -- primeramente en tolueno y posteriormente en una mezcla de to lueno-resina 1:1.

Esta infiltración se efectuó como a continuación se men ciona:

Cada uno de los paquetes celulares se resuspendieron en tolueno después del último cambio hecho con alcohol absoluto. Fueron efectuados dos cambios y las células fueron mantenidas en suspensión durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm y fueron resuspendidos nuevamente en una mezcla de tolueno-resina Araldita 6005 en una proporción de 1:1 y fueron mantenidos los trofozoítos en ésta mezcla por 24 hrs.

Transcurrido éste tiempo de infiltración en la mezcla - de tolueno-resina, se centrifugó nuevamente a 1500 rpm por -- 30 min y los paquetes celulares fueron resuspendidos en resi na únicamente durante 60 min y fueron mantenidos a una tempe ratura de 60 grados centígrados. Este procedimiento se efec tuó dos veces bajo las mismas condiciones. La temperatura --

fué mantenida mediante una placa de calentamiento.

La resina Araldita 6005, en la cual se mantuvieron las células infiltrando en la parte final del procedimiento, fué preparada haciendo una mezcla de 5 ml de Resina Araldita 6005 a los cuales les fué agregado 3.5 ml de anhídrido dodecenil succínico (DDSA) y 0.12 ml de Tris-fenol y fué homogeneizada la mezcla mediante agitación lenta.

Concluído el procedimiento de infiltración de las células en la resina, se procedió a efectuar la inclusión.

III.3.4.f.- La inclusión de las células fué hecha como a continuación se describe: en el segundo cambio de la resina en el procedimiento de infiltración, los tubos fueron centrifugados a 2000 rpm por 30 min. Los paquetes celulares así obtenidos fueron removidos del fondo de los tubos y colocados en diferentes cápsulas de polietileno a las cuales les fué completado su volúmen con resina a modo de que las muestras colocadas quedaran en la parte más baja de aquellas. Concluído lo anterior, se introdujeron a un horno a 60°C durante 24 hrs para que la resina se polimerizara obteniéndose bloques en los cuales, la muestra se localiza en la parte más angosta de aquellas.

#### III.3.4.g.- CORTADO DE SECCIONES

Para el cortado de secciones, a los bloques, en su parte más angosta, se les redujo el área con ayuda de una navaja, a modo de que aquellas sólo presentaran la zona en la --



cual se localizan las células.

Reducida el área, se colocaron y montaron en el micro--tomo y fueron efectuados los cortes. Los cortes que fueron - utilizados fueron hechos en la parte media de la muestra y - las secciones fueron hechas con cuchillas de vidrio.

Obtenidos los cortes de 0.2 micras, éstos fueron monta-- dos en una rejilla de malla de cobre para facilitar su mane-- jo y les fué aplicada una coloración de contraste.

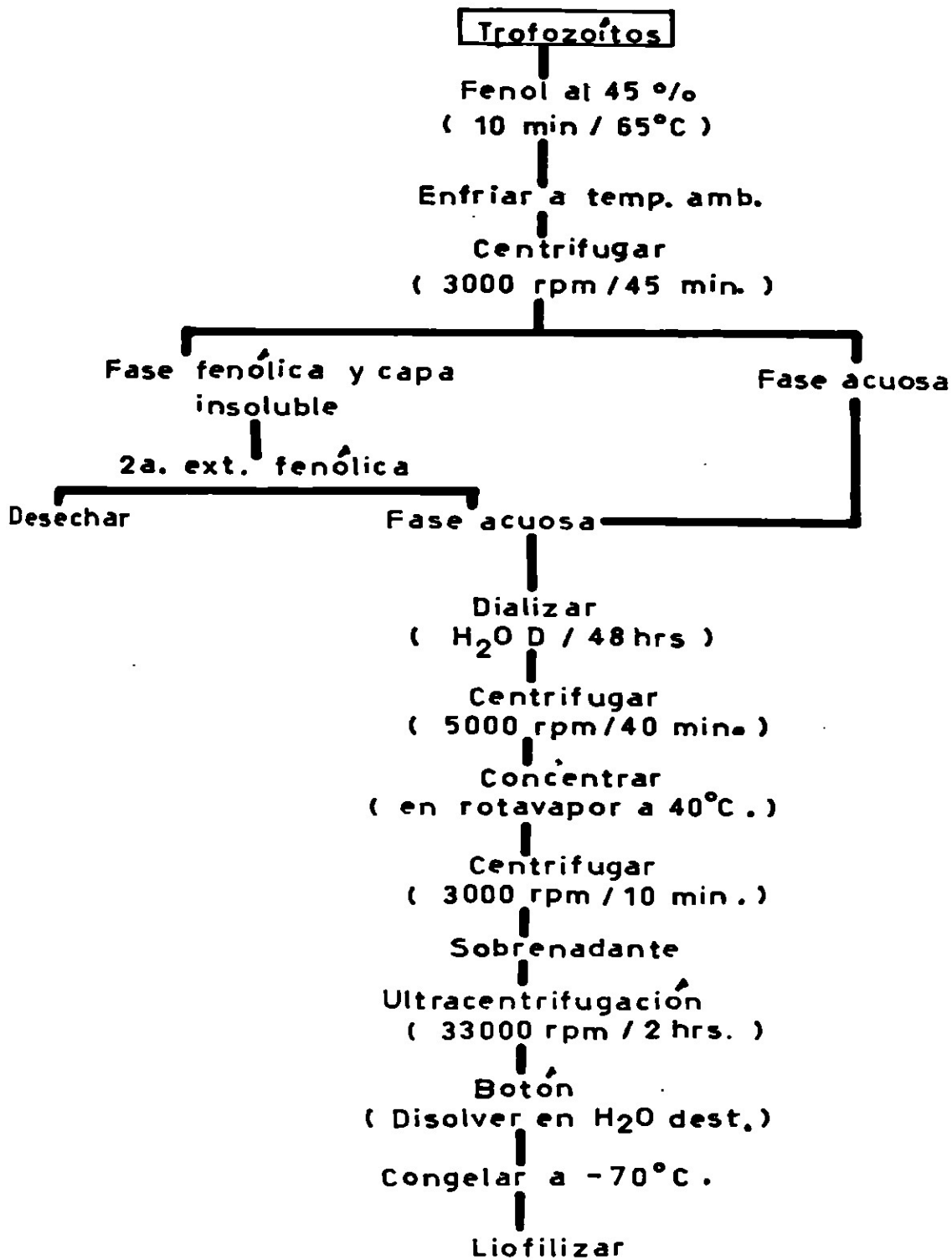
#### III.3.4.h.- CONTRASTACION

La contrastación de las preparaciones fué hecha con te-- tróxido de osmio.

De la solución preparada inicialmente al 1 % v/v en so-- lución reguladora de Tris-HCl 0.05 M pH 7.6 de tetróxido de-- osmio, les fué aplicado a cada corte, montados en las raji-- llas de cobre una gota de ésta solución, la cual fué manteni-- da por 6 hrs. Transcurrido éste tiempo, fueron lavadas cada-- una de las preparaciones con solución reguladora de Tris-HCl 0.05 M pH 7.6 y se dejaron secar las preparaciones al medio-- ambiente sobre papel secante Watman del No.1.

Con la contrastación se concluyó el procedimiento pre -- vio a la observación. La observación de los cortes logrados-- se hizo en un microscopio electrónico Philips EM-200.

FIG.15.—EXTRACCIÓN DE UN ANTÍGENO QUE CONTIENE  
POLISACÁRIDO DE Entamoeba histolítica.  
Europ. J. Biochem. 9:245,1969



( Wetsphal - Lüderitz ,1952 )

## ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN

16-X-1980

Previa inmunización se sangró el conejo para obtener suero normal.

Se le aplica la primera dosis: 2 mgrs. de LPFG disueltos en 0.5 ml de solución salina isotónica estéril más 0.5 ml de adyuvante completo de Freund. Se aplicó en varios sitios por vía subcutánea.

30-X-1980

Segunda dosis: 1 mgr disuelto en 0.5 ml de solución salina isotónica estéril mas 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund. Se aplica en la misma forma que la primera.

6,13 y 20-X-80

Se repite lo mismo que lo anterior.

28-X-1980

13-II-1981

Se reta nuevamente usando 2 mgr de antígeno en solución salina con adyuvante incompleto de Freund.

20-II-1981

Se sangra al conejo y se titula el suero por hemólisis pasiva previa de complementación.

FIG.No.— 16 .— Esquema de Inmunización de la LPFG en el conejo.

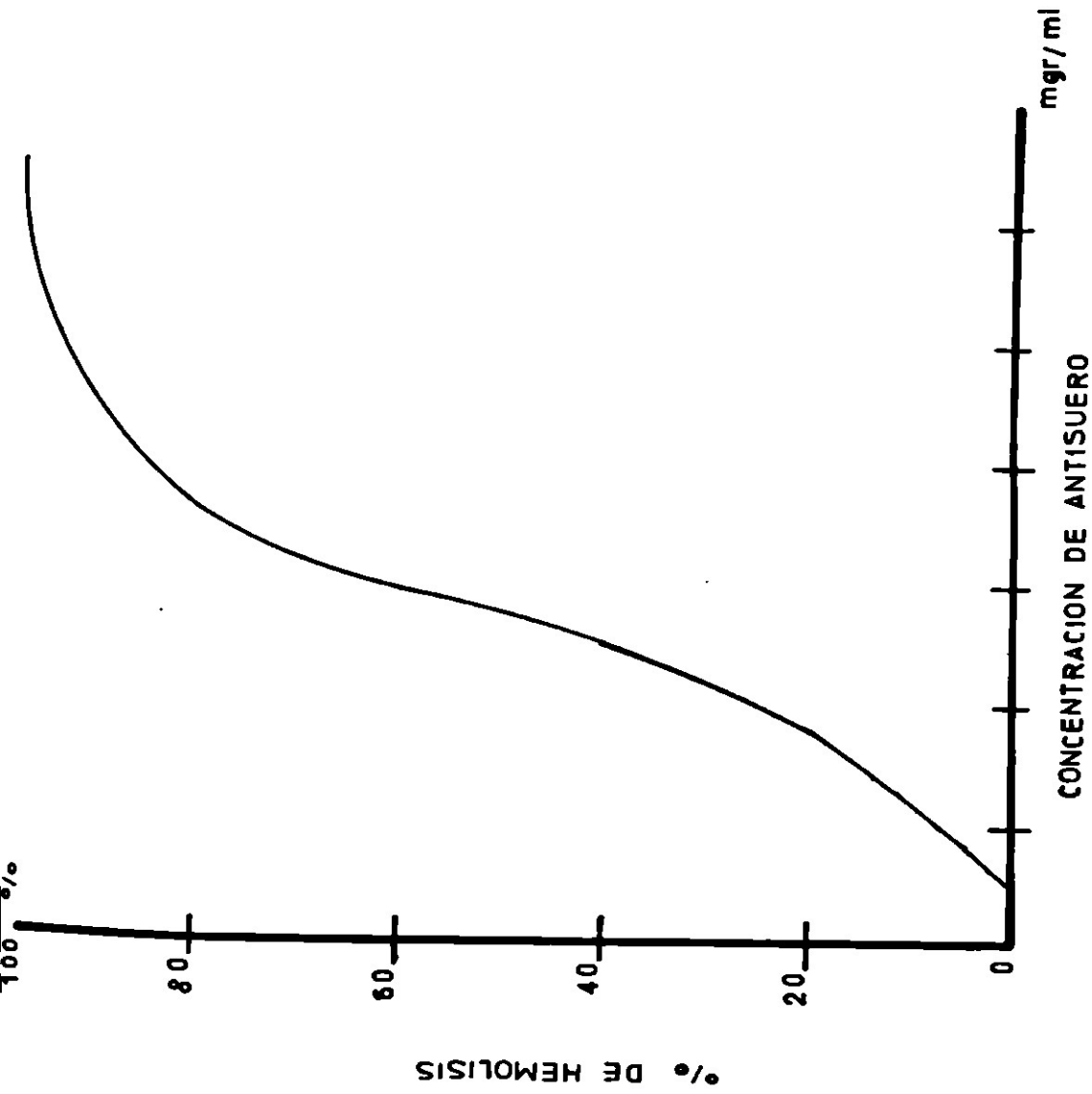


FIG. No.17.-Relación entre la concentración de antisuero específico y el porcentaje de una cantidad constante de GRC hemolizados en presencia de una cantidad constante de complemento de cobayo.

Campbel.: Immunological Methods. Addison Wesley P.C.I. 193, 1977

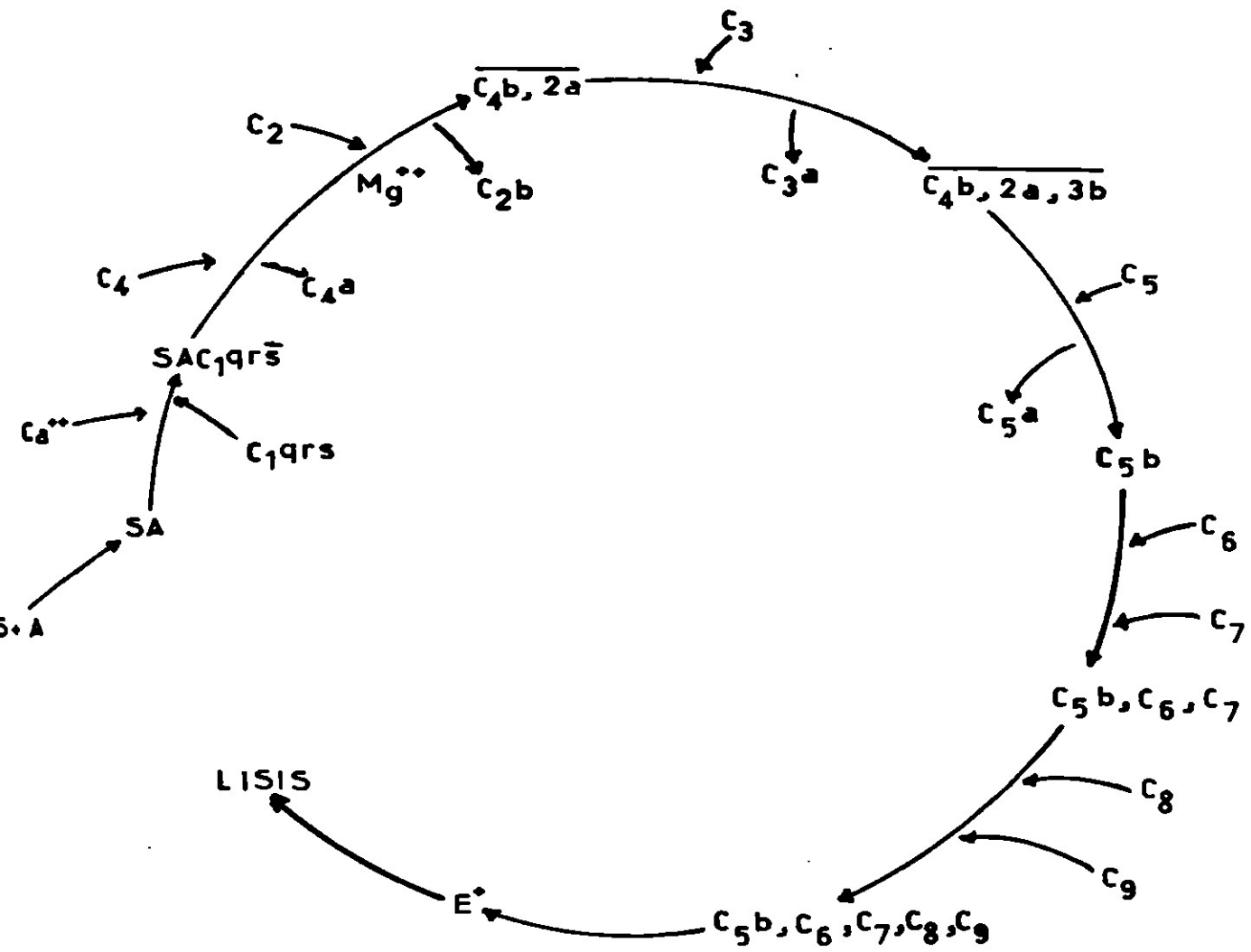
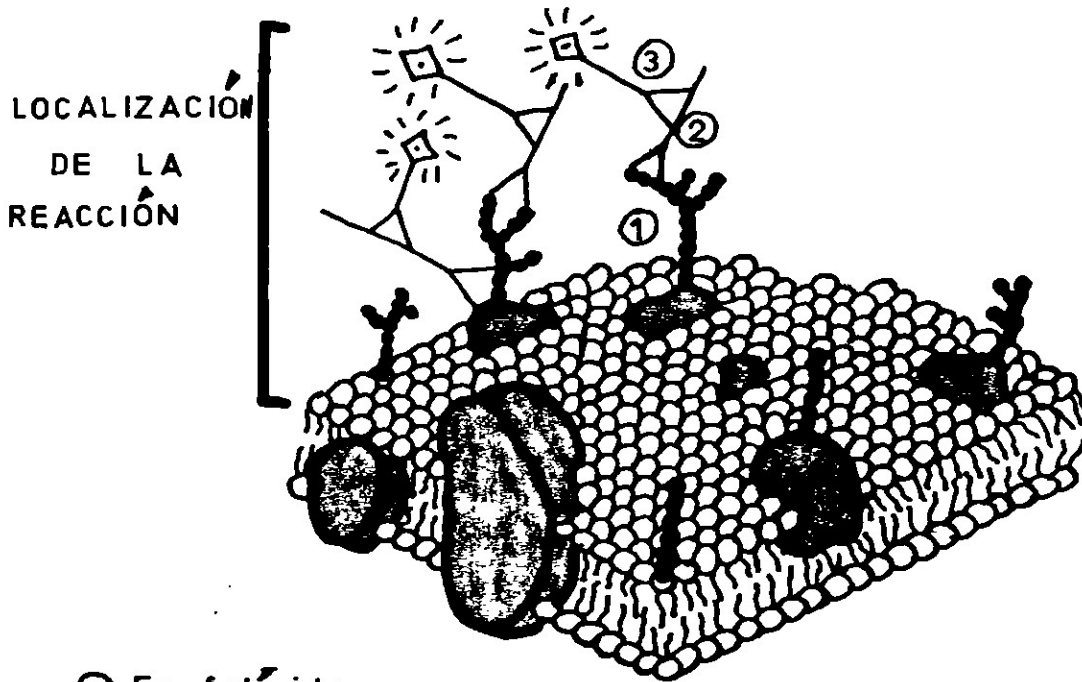


FIG. No.18.-Secuencia de reacciones en la hemólisis inmune. S=sitio antigénico del eritrocito; A=anticuerpo; C=complemento (componentes y subcomponentes); E=eritrocito con membrana degradada irreversiblemente.  
Clinical Immunology.2nd.ed.Harper and Row. New York.1976



 Fosfolípido

 Molécula  
Proteica

 Cadena Glicídica

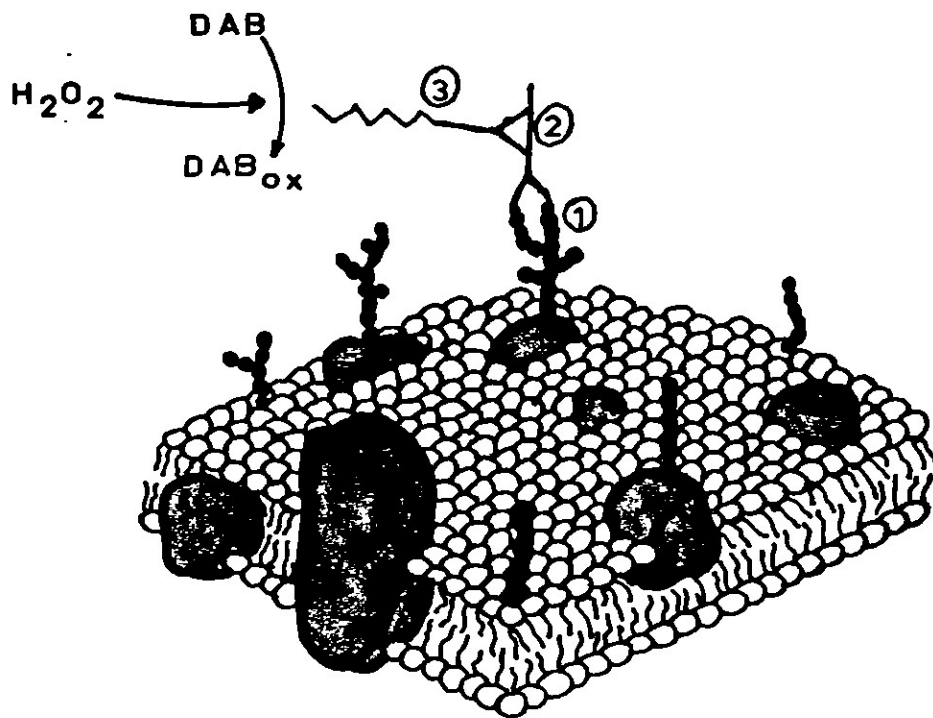
 Glicolípido

1) LPG

2) Anti-LPG

3) Anti IgG-Fluoresceína

FIG.No. 19.- Esquema de la Inmunofluorescencia Indirecta. Estructura de la membrana celular según el modelo de Mosaico Fluído. ( Kagan.I.G. and Norman.L. In: Manual of Clinical Microbiology. 2th ed. Am.Soc.Mic. 650,1980 )



 Fosfolípido

 Molécula Proteíca

 Cadena Glicídica

 Glicolípido

1) LPFG

2) Anti-LPFG

3) Anti IgG - Peroxidasa

FIG.No. 20.- Microscopía Electrónica:  
 Reacción de la Peroxidasa. Estructura de la membrana  
 celular según el modelo de Mosaico Fluído.  
 J.Histochem.Cytochem. 22(12): 1135,1974

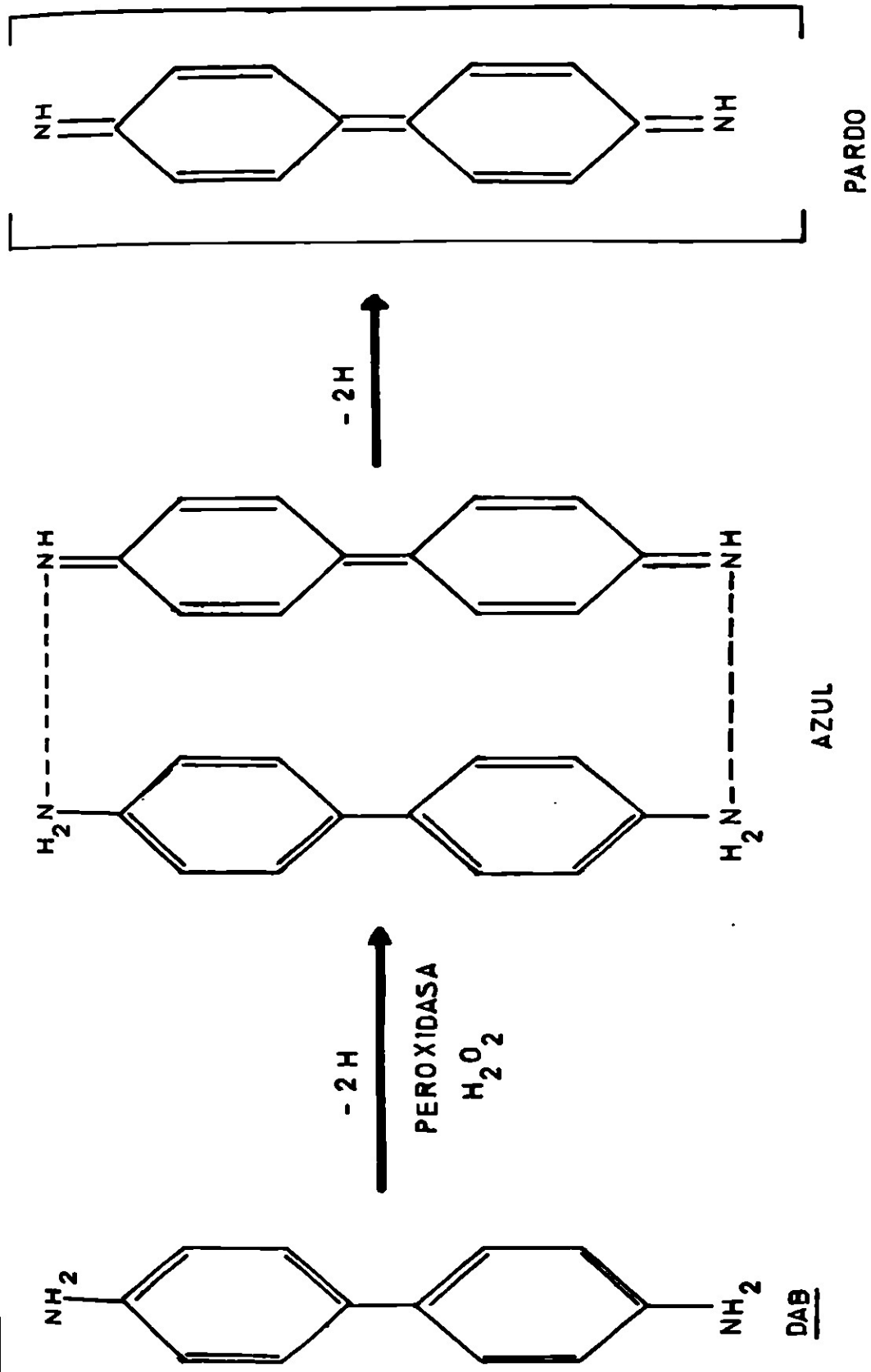


FIG. No.21.- Esquema que muestra la reacción de la enzima Peroxidasa con la pp'-diaminobencidina. (J.Clausen.; Técnicas Inmunoquímicas para la Identificación de Macromoléculas; Ed.M.M. 66,1975)



CAPITULO IV.- R E S U L T A D O S Y  
O B S E R V A C I O N E S

Los resultados obtenidos en la presente investigación - son los que a continuación se presentan en las gráficas y figuras, las cuales permiten conocer la composición y localización del antígeno extraído, concentración de los diferentes-antisueros utilizados en los ensayos correspondientes.

En la gráfica No. 22 se puede observar la curva lograda en la determinación del espacio vacío de la columna de Ultrogel AcA 22 utilizada para la determinación del peso molecu--lar aproximado del antígeno extraído, encontrándose que éste fué de 11 ml.

Para la determinación del peso molecular del antígeno - se comparó la velocidad de elusión de éste respecto a la de la catalasa. La elusión de la catalasa permitió saber que --ésta eluía a un volúmen de 32 ml, lo cual puede ser observado en la gráfica no. 23, y éste fué determinado mediante el-método de Lowry.

De igual manera, fué eluído el antígeno purificado, en-las mismas condiciones a la elusión de la catalasa, siendo -ésto determinado mediante el método de la Antrona, con lo -cual se pudo conocer que iniciaba su elusión a un volúmen de 12 ml. Estos resultados permitieron conocer un peso molecu -lar del antígeno de aproximadamente 100,000 a 210,000 daltons de peso molecular.

El análisis inmunoquímico en cromatografía de fase ga--seosa (fase gas-líquido) permitió conocer la composición del antígeno obtenido. Este análisis arrojó el resultado que de-muestra que un 85 % del antígeno son azúcares neutros como -la glucosa, galactosa, manosa, y azúcares aminados como la--glucosamina y la galactosamina; un 8 % de aminoácidos (por -ción peptídica constante); de un 2-3 % de ácidos grasos y de

1-2 % de fósforo (determinado como fósforo inorgánico) lo -  
cual se presenta en la gráfica no. 25.

En la gráfica no. 26 se puede observar el espectro lo--  
grado para azúcares obtenido en la determinación efectuada -  
a través de la cromatografía en fase gaseosa.

Todos éstos resultados permitieron diferenciar el men -  
cionado antígeno como una Lipopéptidofosfoglicana (LPFG).

En la fig.no. 27 se puede observar la curva obtenida en  
la purificación de la IgG anti-LPFG obtenida por precipita -  
ción y pasada a través de una columna de DEAE-celulosa con -  
lo cual le fué efectuado análisis espectrofotométrico donde  
el pico corresponde a las fracciones en las que se encuentra  
una cantidad de gammaglobulina. La concentración a la cual -  
se logró obtener a ésta globulina fué de 35.30 mgrs/ml.

En la fig. no. 28 se puede observar la gráfica que co -  
rresponde a la purificación de IgG normal a partir del suero  
del conejo previo a la inmunización donde el pico correspon -  
de a las fracciones que fueron mezcladas y concentradas, ob -  
teniéndose un concentrado de 1.47 mgrs/ml de proteína.

Los anticuerpos inducidos en el conejo inoculado contra  
la LPFG fueron detectados mediante difusión radial (Ouchter -  
lony) y contrainmunolectroforesis (CIEF).

En el ensayo de Ouchterlony fueron utilizados: a).- sue -  
ro de conejo anti-LPFG (Ac1); b).- Suero de conejo normal (-  
Ac2); c).- suero de conejo normal diluído 1:2 en solución sa -  
lina isotónica estéril (Ac3) y d).- solución salina isotóni -  
ca. Co ésta técnica utilizada se pudo observar como resulta -  
do la aparición de una sóla banda de precipitación entre el -  
pozo que contiene el suero del conejo anti-LPFG (Ac1) y el -  
que contiene el antígeno en una concentración de 100 micro -

gramos/ml. Esto puede ser observado en la gráfica no. 29.

En la fig. no. 30 se presenta la gráfica del ensayo de CIEF, una vez procesada la placa, donde pueden ser observadas las bandas de precipitación entre los pozos que fué colocado el antígeno en una concentración de 100 microgramos/ml y los que contienen el suero del conejo inmunizado ( pozos no. 1 y 2) con lo cual, junto con los resultados obtenidos en el ensayo de Ouchterlony, se pudo concluir la producción de anticuerpos en el suero del conejo inoculado con el antígeno - LPFG.

Junto con el suero del conejo inmunizado, en éste ensayo, fueron colocados sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano comprobado mediante biopsia, encontrándose bandas de precipitación sólo en dos de éstos, de un total de cuatro colocados, lo que permitió obtener un porcentaje del 50 % de sueros de pacientes con diagnóstico comprobado de absceso hepático que reaccionaron al retarlos al antígeno extraído. Estos resultados aún no pueden ser tomados como concluyentes, ya que la población estudiada no es representativa, además de que el número de ensayos efectuados fué muy reducido.

En la fig. no. 31 se presenta la placa que fué utilizada para la titulación de los anticuerpos obtenidos en el suero del conejo inoculado. La presencia de hemólisis en los pozos correspondientes a la serie D, E, F y G arroja el resultado de un título de 1:1280 unidades de dilución del antígeno, lo que representa la potencia del suero ante la presencia del antígeno. En la fig. no. 32 se presenta la gráfica correspondiente a la titulación del complemento de cobayo el cual fué utilizado en el ensayo de la hemólisis pasiva, donde

se encontró que fué de 660 unidades hemolíticas (660 UH<sub>50%</sub>).

La figura no. 33 corresponde a la curva de la determinación del espacio vacío de la columna utilizada para la purificación del conjugado anti-IgG de conejo-HRPO, donde éste fué de 14 ml, utilizando azul dextrana como marcador.

En la fig. no. 34 se puede apreciar el resultado obtenido en la purificación del conjugado Anti-IgG-HRPO logrado mediante el análisis espectrofotométrico efectuado a 280 nm y 403 nm de densidad óptica. El primer pico de la curva corresponde al conjugado y el segundo al remanente de enzima que no reaccionó con la anti-IgG. En la fig. no. 35 se puede observar el factor RZ para cada una de las fracciones recolectadas en el procedimiento de purificación de aquel.

Al conjugado purificado le fueron efectuados ensayos de actividad tanto para la Anti-IgG como para la HRPO lográndose los resultados que se presentan en la fig. no. 36 reportándose éstos resultados como porcentajes con respecto a la actividad original.

Finalmente, los resultados obtenidos en los ensayos -- efectuados con la Inmunofluorescencia indirecta y la microscopía electrónica pueden ser observados en las figuras 38 a la 43 y de la 44 a la 45, respectivamente.

La inmunofluorescencia indirecta demostró que la lipopéptidofosfoglicana se encuentra sólo en la superficie de los trofozoítos, ya que la fluorescencia sólo se aprecia en la periferia de las células tratadas. Debo aclarar que las gráficas corresponden a las placas obtenidas a partir de los ensayos efectuados donde éstos presentan una coloración de contraste propuesta por mi parte.

A éste hallazgo se le puede agregar el resultado logra-

do trabajando con microscopía electrónica utilizando la antiIgG de conejo producida en cabra y marcada con peroxidasa de rábano, donde se corrobora su localización, y puede ser observado en las figs. no. 44 y 45.

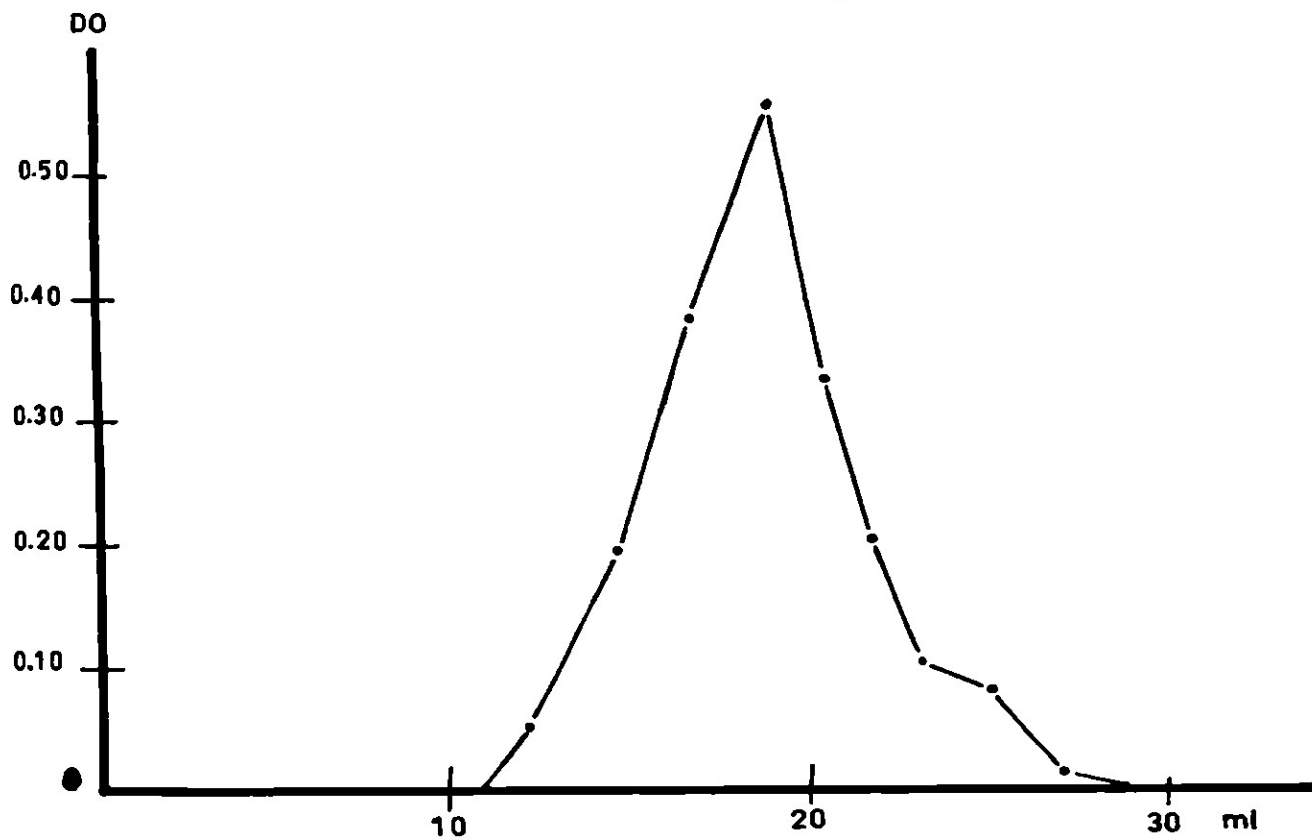


FIG-No.22.- Gráfica de la determinación del espacio vacío de una columna de Ultrogel AcA 22. Marcador: Azul Dextrana. DO: 254 nm ( 15 x 54 cm )

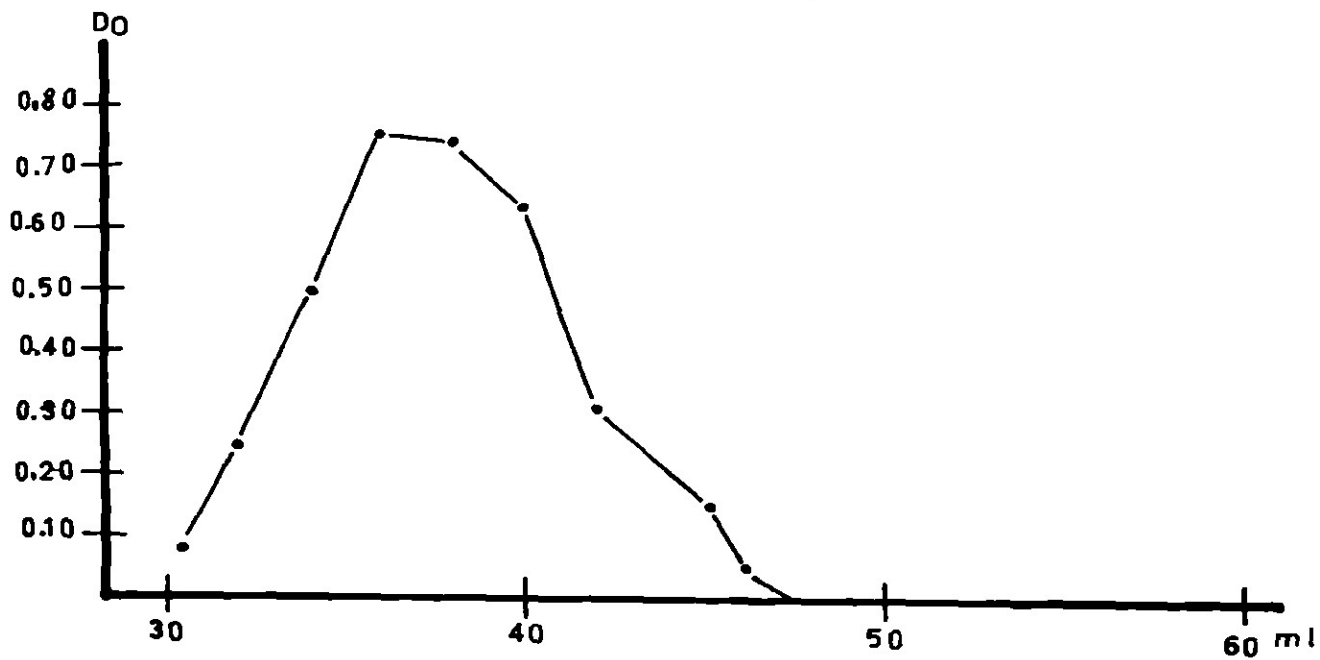


FIG.No.23.-Gráfica del marcador catalasa  
eluido en una columna de Ultrogel Aca 22 utilizando  
el método de Lowry DO:660 nm



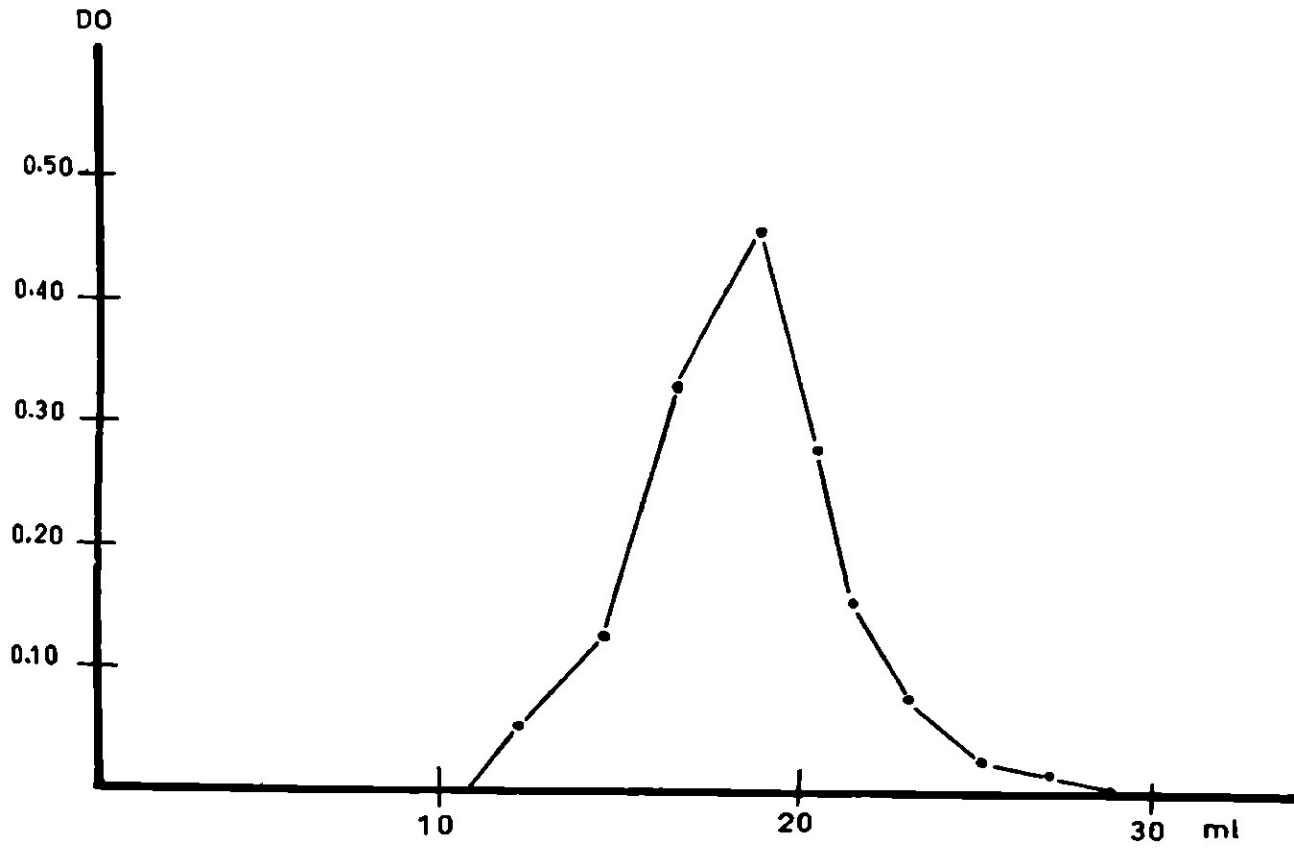


FIG.No. 24.- Gráfica de elusión del antígeno LPFG determinada por el método de la Antrona. D.O: 625 nm

BIOMOLECULAS	CANTIDAD (%)
AZUCARES	85
AMINOACIDOS	8
ACIDOS GRASOS	2-3
FOSFATOS	1-2

FIG. No. 25.- Composición de la LPFG obtenida por cromatografía en fase gaseosa.

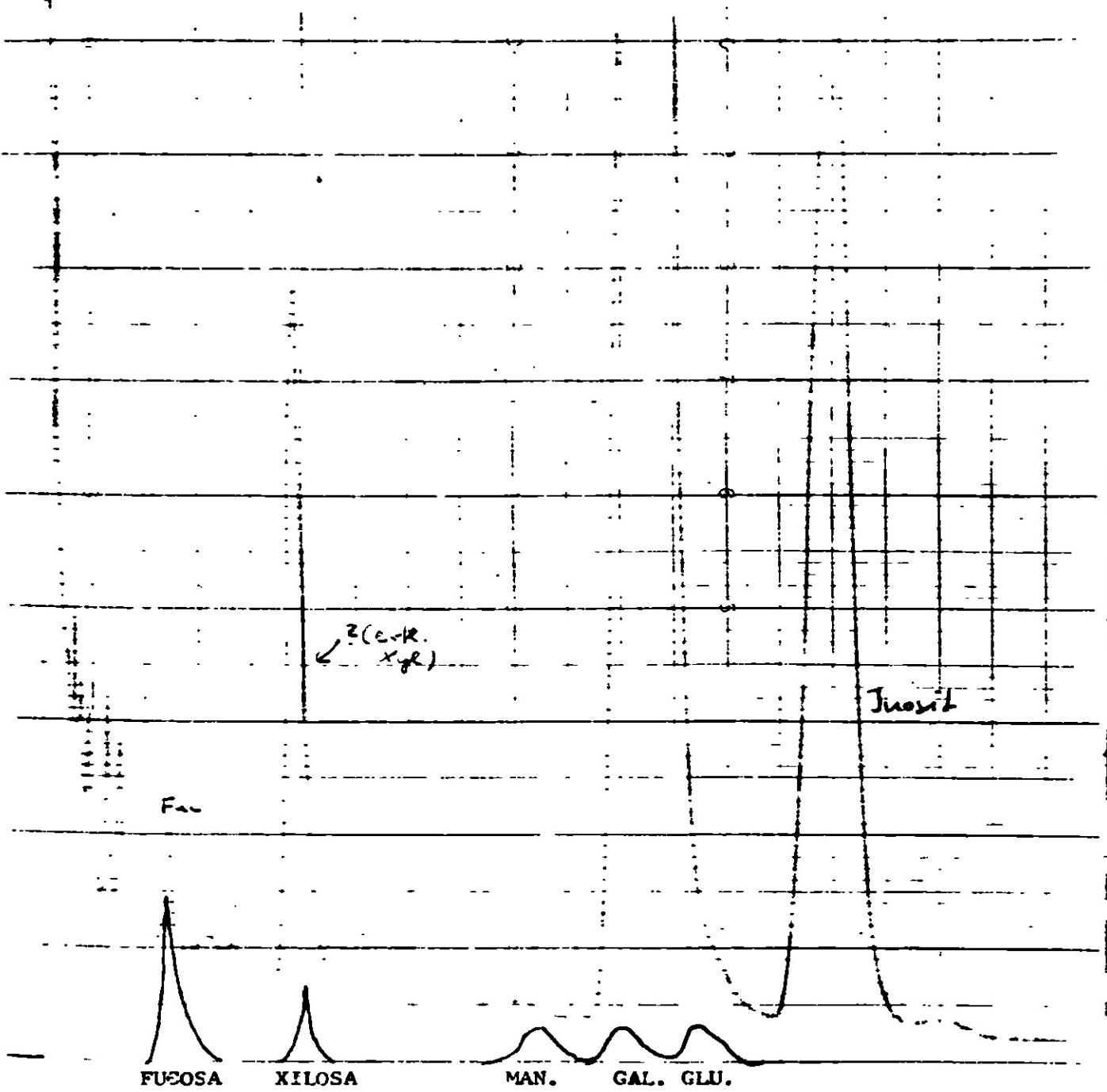


FIGURE 26

GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY  
 NEUTRAL SUGARS AS ALDITOL ACETATE  
 VARIAN AEROGRAF MODEL:  
 Flame Ionization Detector  
 Glass Column: 0.5 x 150 cm filled with ECNSS-M ( 3% on Gas-Chrom Q at 170°C)  
 Control: Inositol

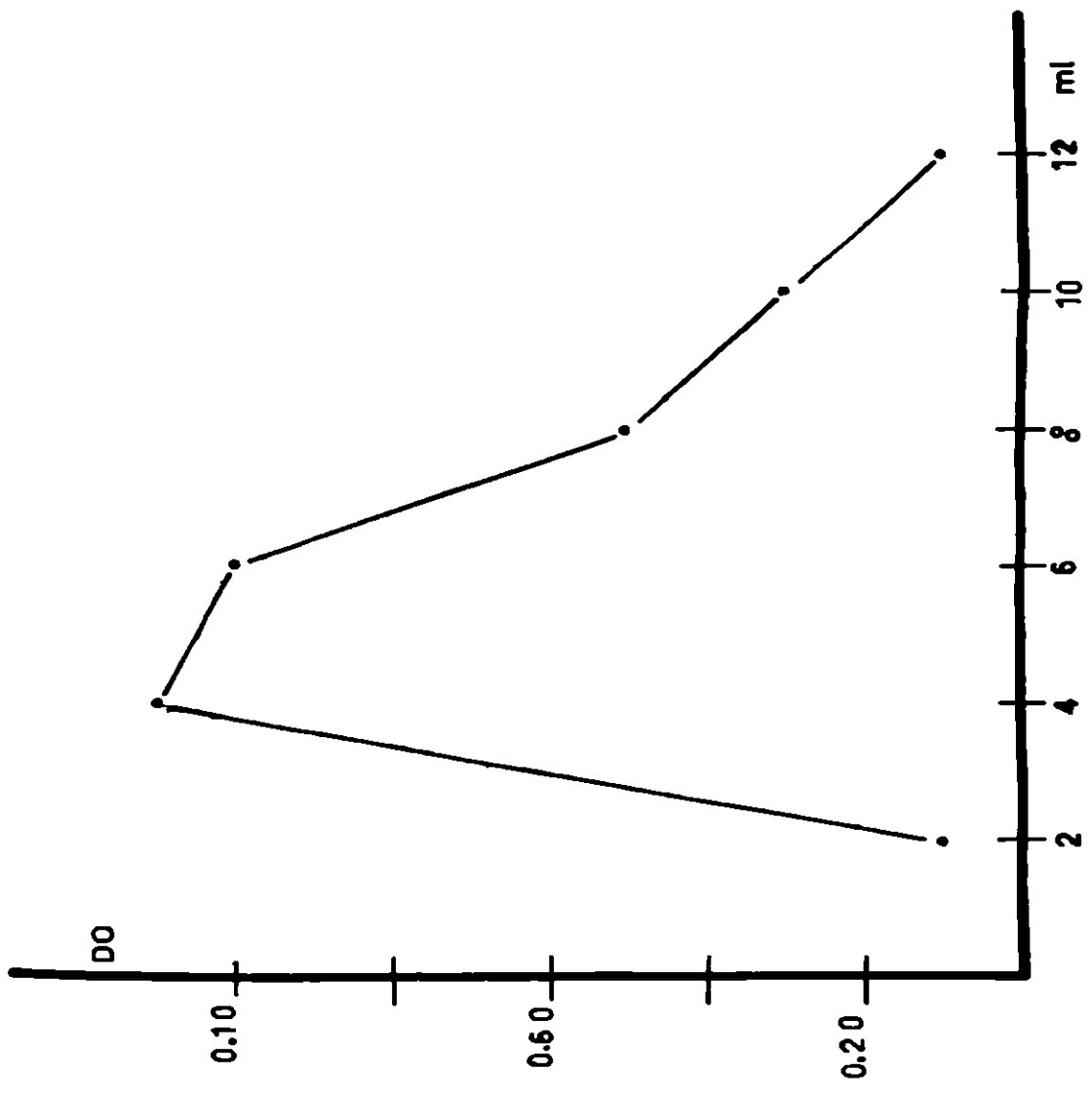


FIG.No.27.- Purificación de IgG-Anti-LPFG obtenida por precipitación y pasada por columna de DEAE-Celulosa. Eluyente:regulador de fosfatos 0.01 M, pH 8 DO:280 nm

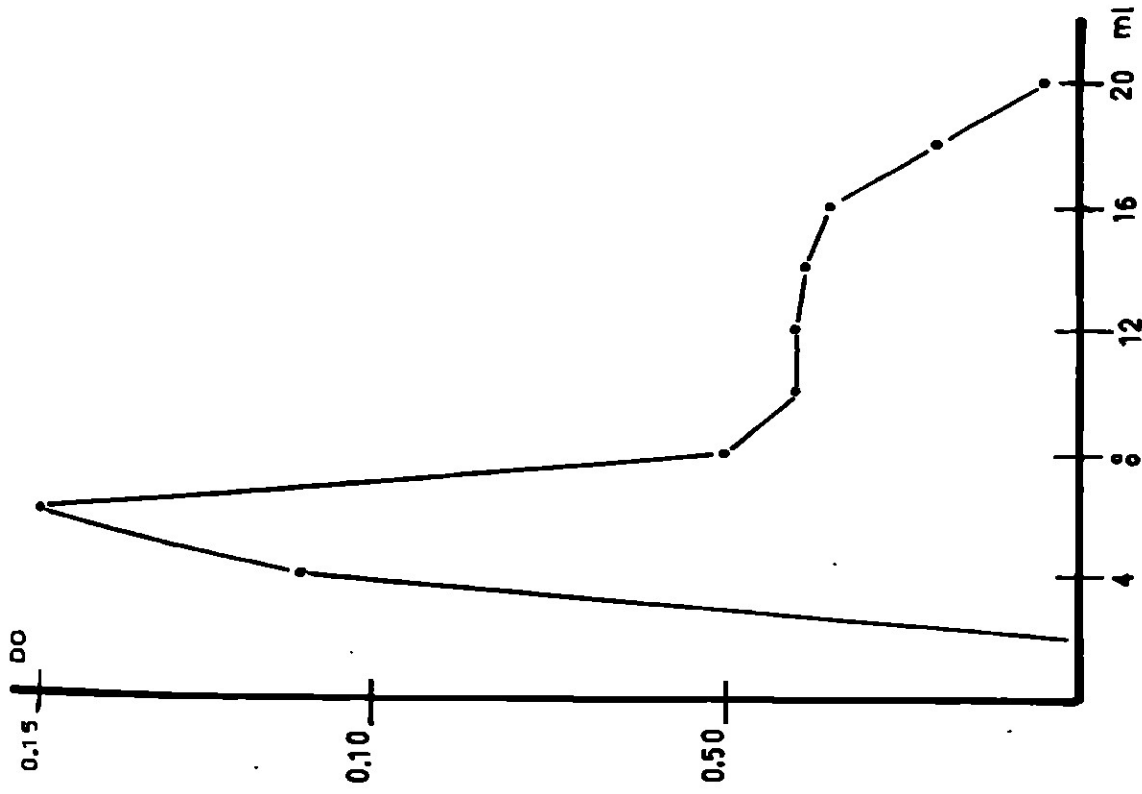


FIG. No.28.- Purificación de IgG Normal de conejo obtenida por precipitación y pasada por columna de DEAE-Celulosa. Eluyente: regulador de fosfatos 0.01M, pH 8 DO: 280 nm

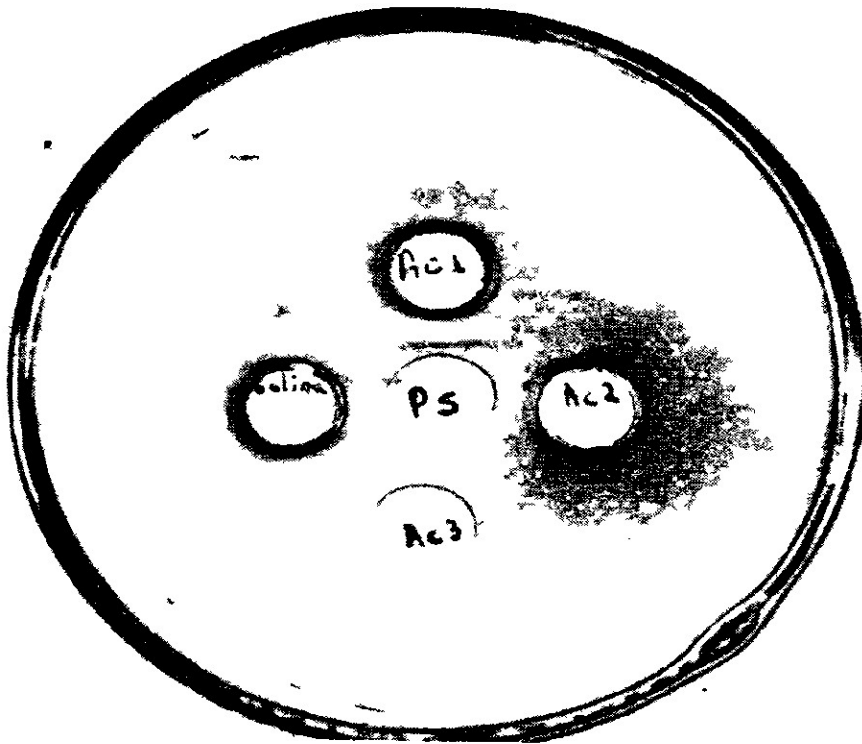


FIG. NO. 29.- Doble inmunodifusión (IDF) en geles de agarosa (Cuchterlony). El pozo central (PS) contiene el antígeno extraído por el método del fenol-agua en una concentración de 100 microgramos/ml. En los pozos situados alrededor se encuentra lo siguiente: Ac1: suero de conejo anti-LPPG; Ac2: suero de conejo normal; Ac3: suero de conejo normal diluido 1:2 en solución salina y solución salina utilizada como control. Obsérvese la banda de precipitación entre el Ac1 y PS.

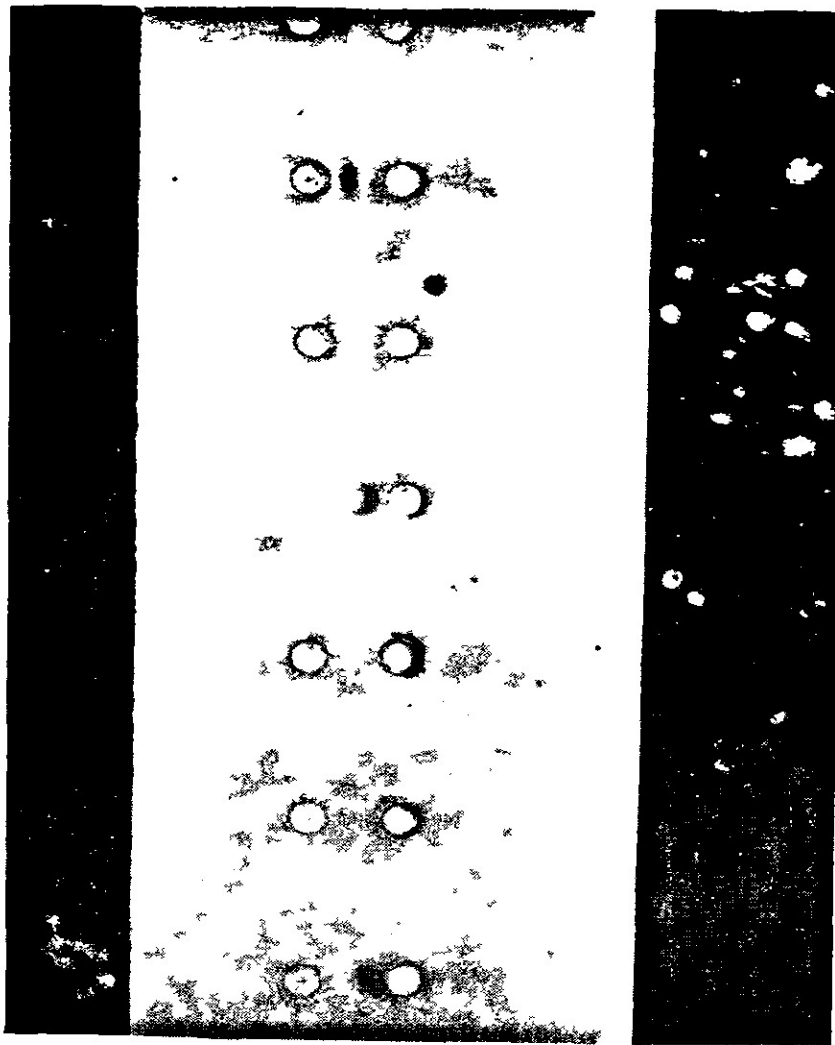


FIG. NO. 30.- Contrainmunolectroforesis (- CIEF) de la LPFG de E. histolytica retado contra: suero de conejo inmunizado( pozos de la izquierda: 1 y 2); suero normal de conejo previo a la inmunización (pozo no.3) y sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano (- pozos del 4 al 7). La LPFG fué disuelta en solución salina isotónica estéril en una concentración de 100 microgramos/ml. Obsérvense las bandas de precipitación entre los pozos: 1,2, 4 y 7.

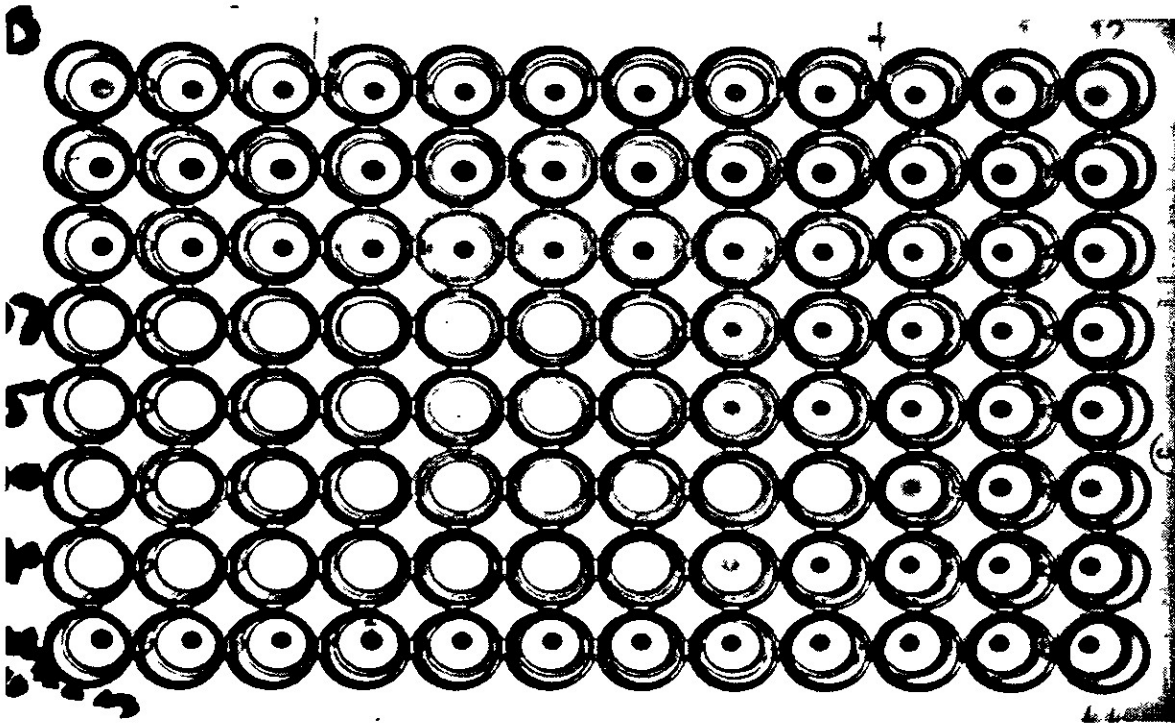


FIG. NO. 31.- Placa de microtitulación de anticuerpos por hemólisis pasiva. Obsérvense los pozos de las series D, E, F y G en los que se distingue la hemólisis. - Título del suero: 1:1280



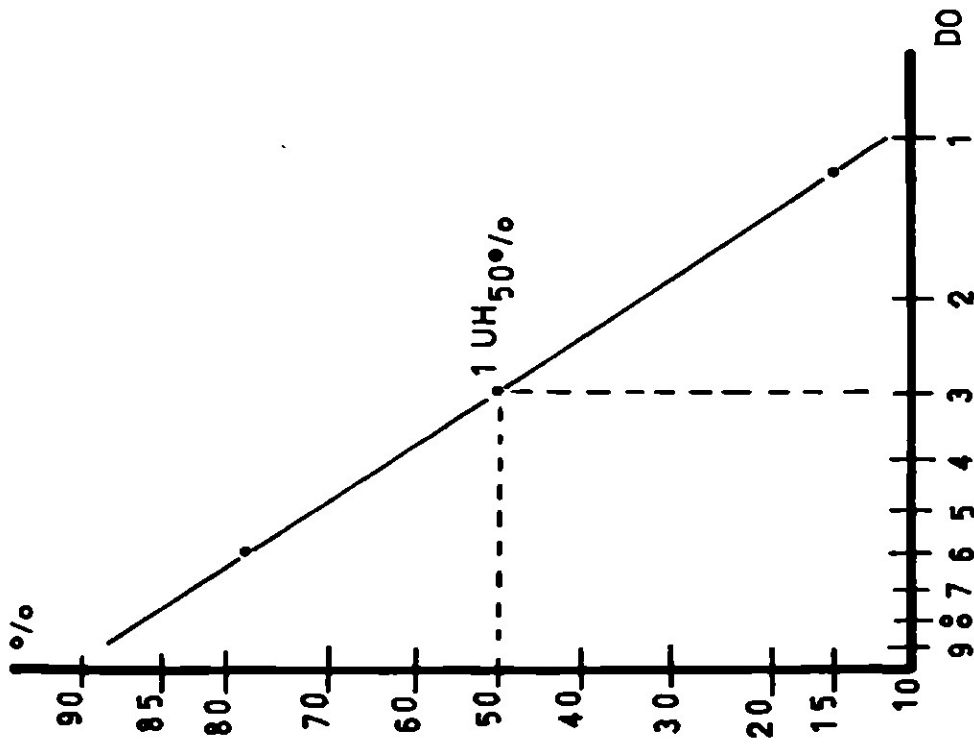


FIG. No.32.- Gráfica de la titulación  
de complemento de cobayo. (UH<sub>50</sub>%)

Dil. 1:200 DO:550 nm

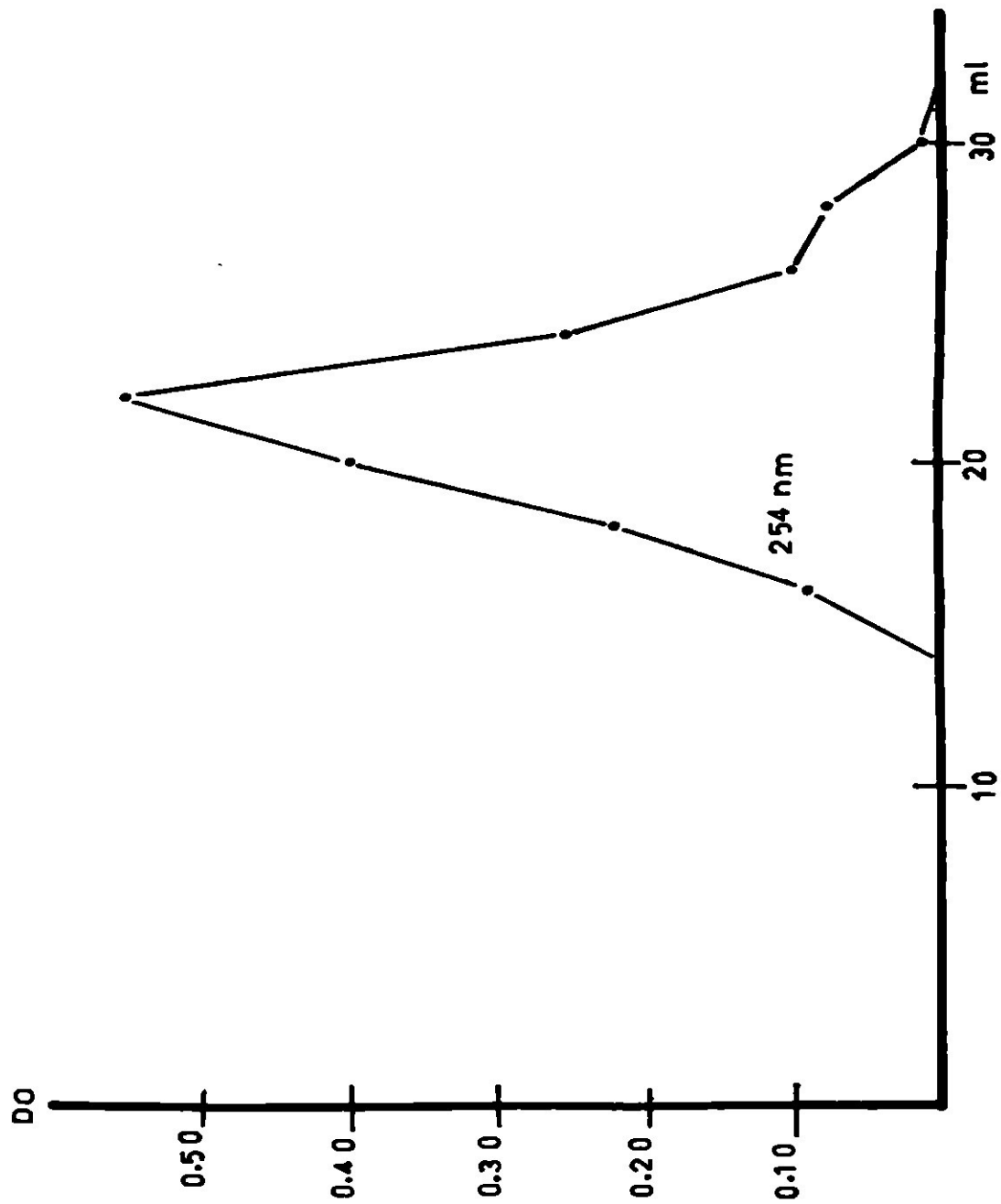


FIG. No.33.- Gráfica de la determinación del espacio vacío de una columna de Ultrogel AcA 34 de 70x1cm. Fracciones de 2 ml/c/u. Longitud de onda: 254nm.

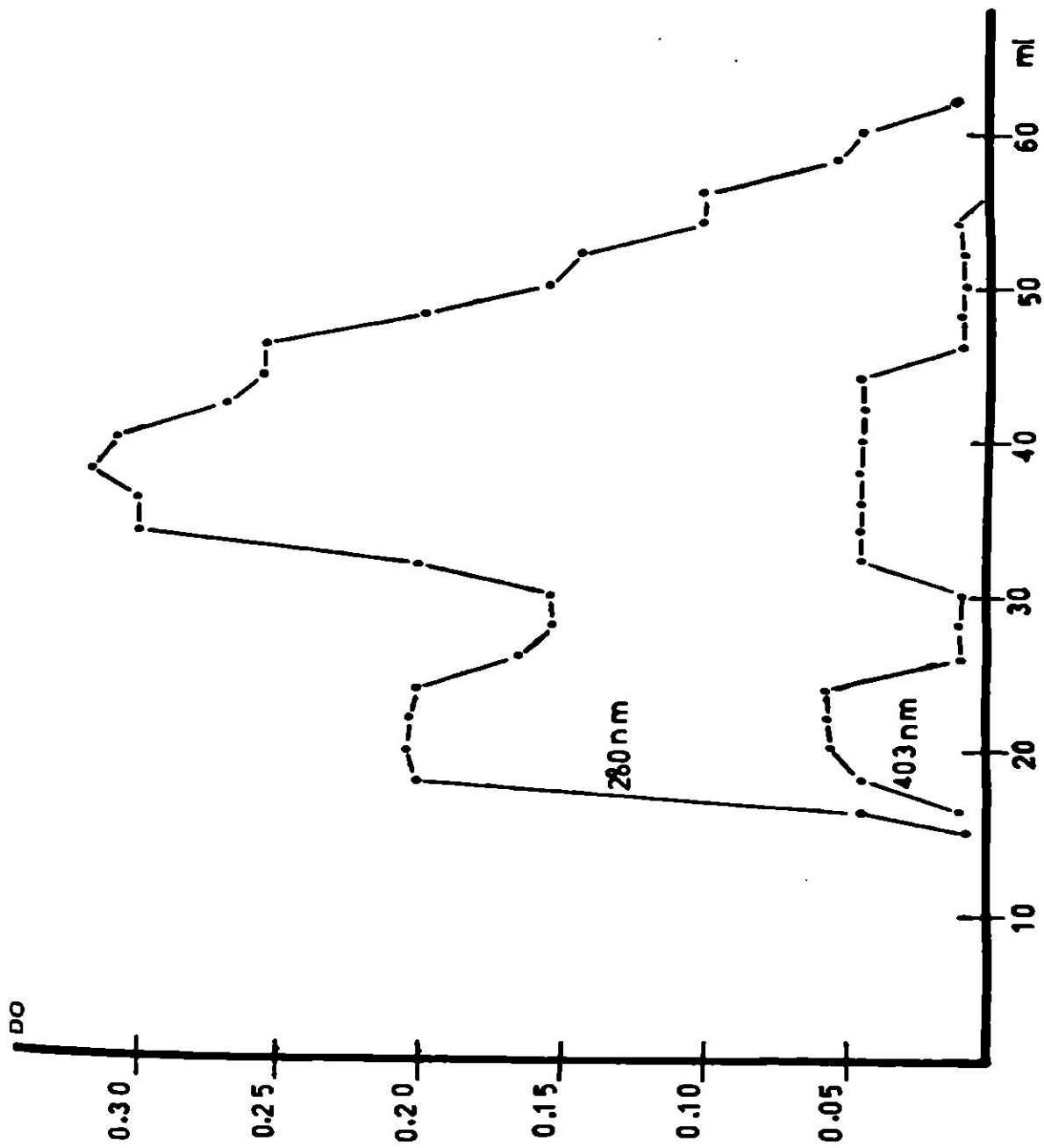


FIG. No.34 -- GRÁFICA DE ELUSIÓN DEL ANTICUERPO  
 Anti-LPF6 CONJUGADO A HRPO. EL CONJUGADO FUÉ  
 CROMATOGRAFIADO EN UNA COLUMNA DE SEPHADEX  
 G-200. ELUYENTE: PBS, PH 7.4

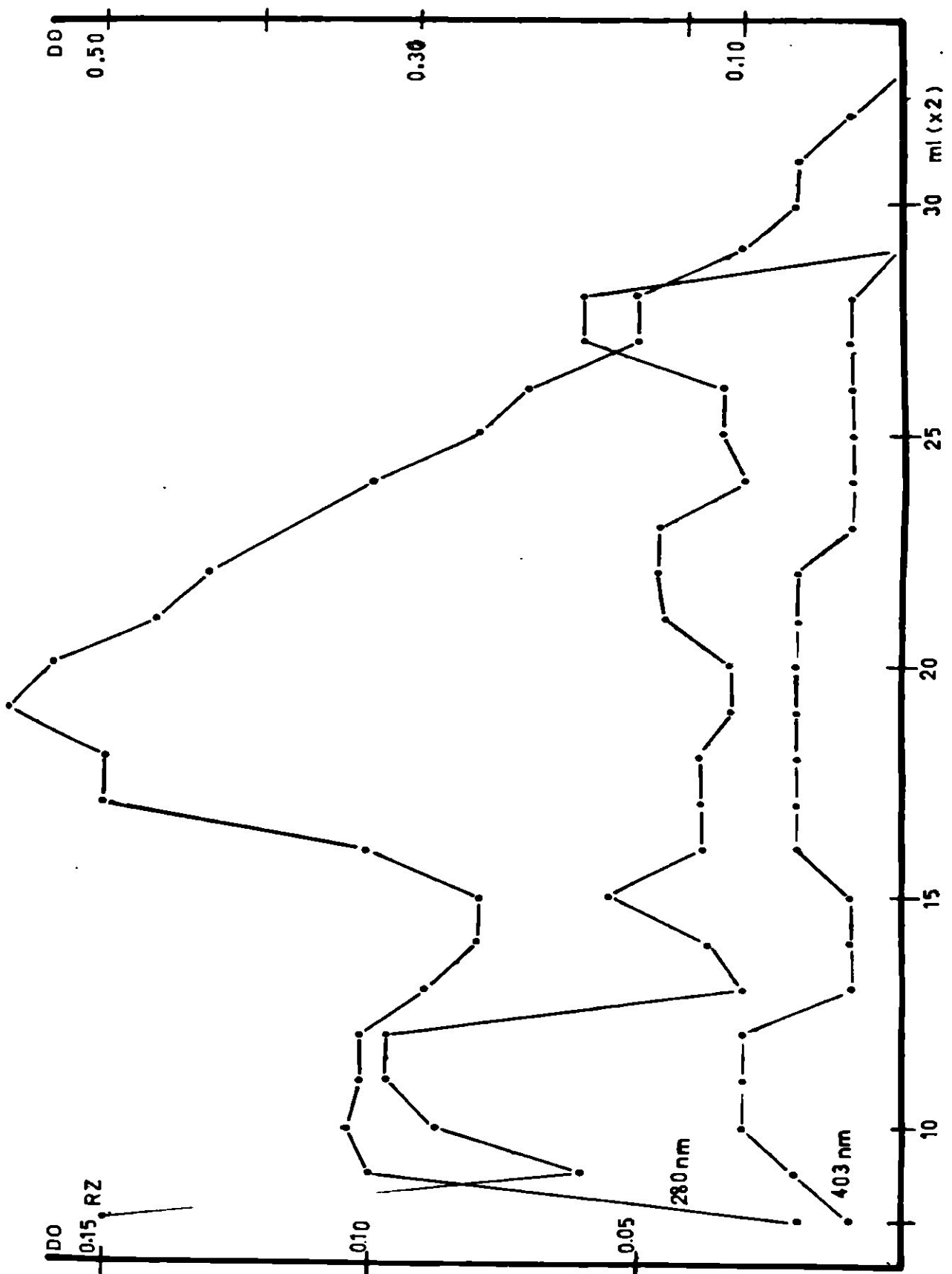


FIG. No. 35.-Elusión del conjugado Anti-IgG-HRPO.  
Relación RZ.(403nm/280nm)

CONDICIONES DE OXIDACION		HRPO - ALDEHIDO		HRPO - IgG		PICO HRPO - IgG	
DURACION ( min. )	NaIO <sub>4</sub> ( M )	RZ	ACTIVIDAD HRPO	ACTIVIDAD HRPO	ACTIVIDAD IgG	ABSORBANCIA 403 nm	ACTIVIDAD HRPO
30	0.80	1.55	68%	98%	92%	73%	68%

FIG.No.36 .- Gráfica en la que se presentan las condiciones de oxidación, actividades de la HRPO y la Anti-IgG de conejo durante la preparación del conjugado HRPO-Anti-IgG.

SUERO	LECTURA A 280 nm	DILUCION	CONCENTRACION mgr/ml
SCN	1.60	1:40	47.10
IgG <sub>CN</sub>	0.05	1:40	1.47
SCT-Anti-LPFG	1.40	1:80	82.40
IgG-Anti-LPFG	1.20	1:40	35.30
Anti-IgG conej.	1.20	1:80	70.60
Anti-IgG-Fluores.	0.98	1:32	23.10
Anti-IgG-HRPO	0.10	1:40	2.94

FIG.No. 37 .. Gráfica en la que se presentan las concentraciones de los diferentes sueros y antisueros utilizados.

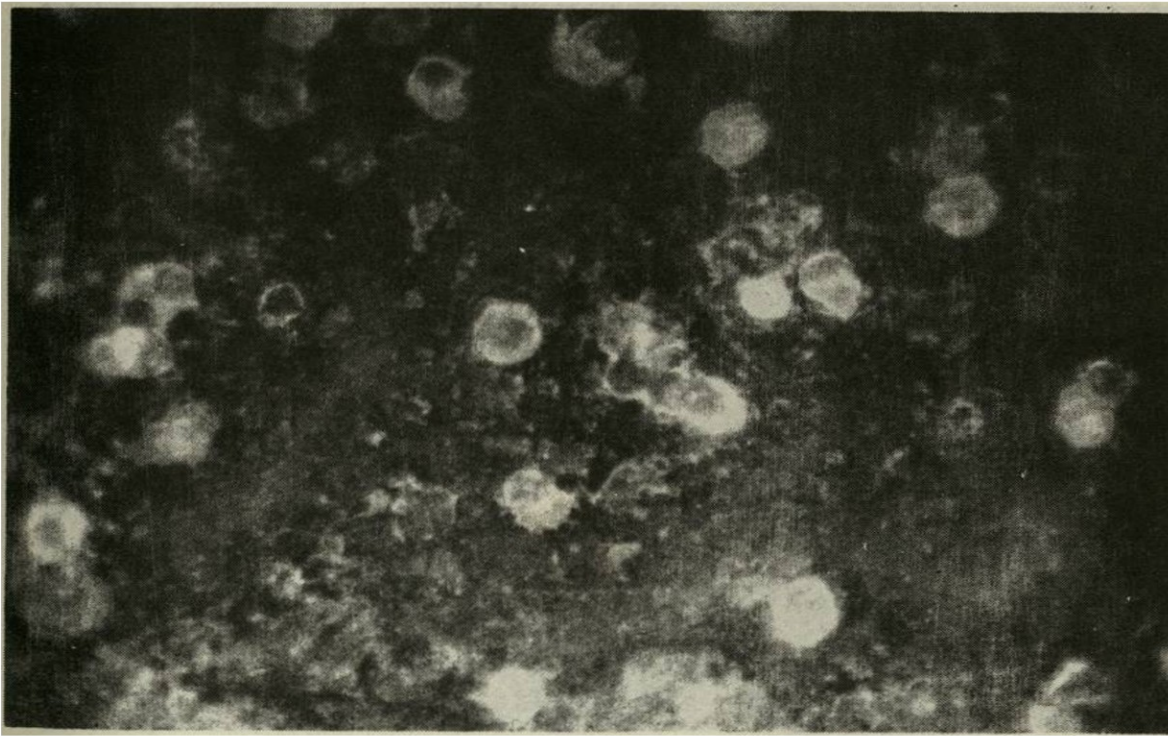


FIG. NO. 38.- Prueba de Inmunofluorescencia indirecta con trofozoítos de E. histolytica con suero total de conejo inmunizado anti-IFFG. Obsérvense los trofozoítos con el halo de fluorescencia y la fluorescencia inespecífica. Placa no teñida con azul de Evan. 100 X

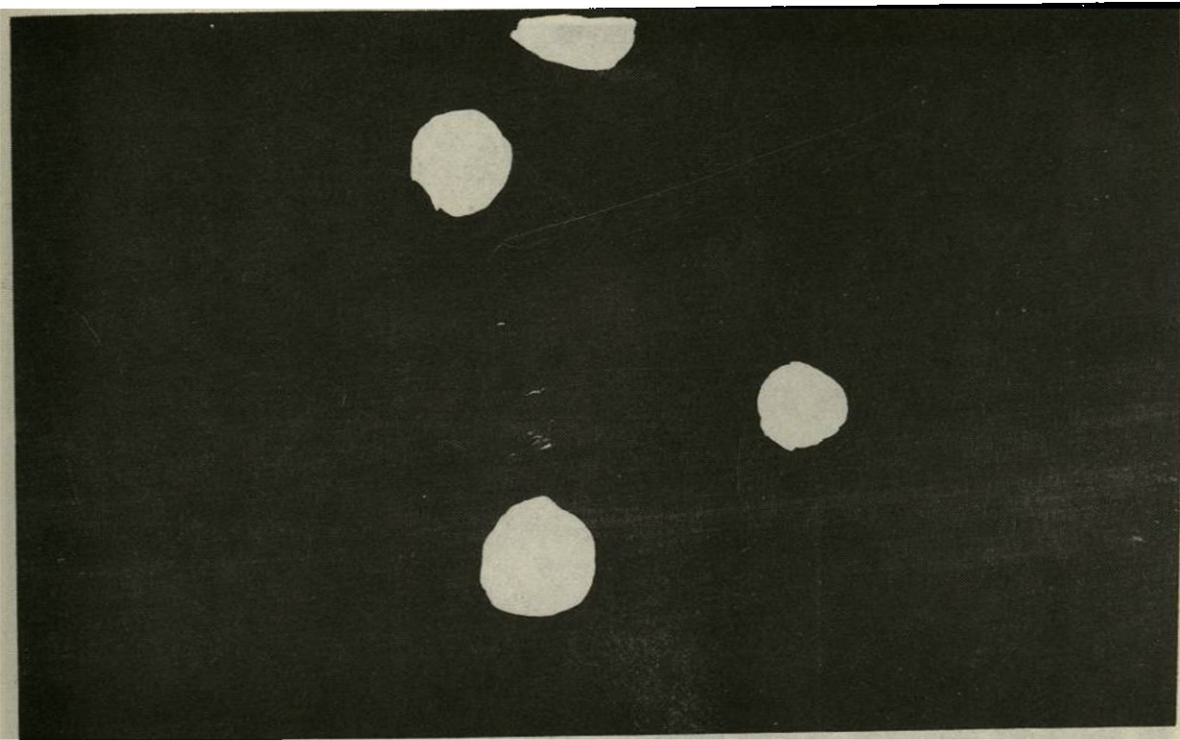


FIG. NO. 39.- Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta con trofozoítos de E. histolytica con suero de cabra anti-IgG de conejo marcada con fluoresceína (Control negativo). Objetivo de inmersión.



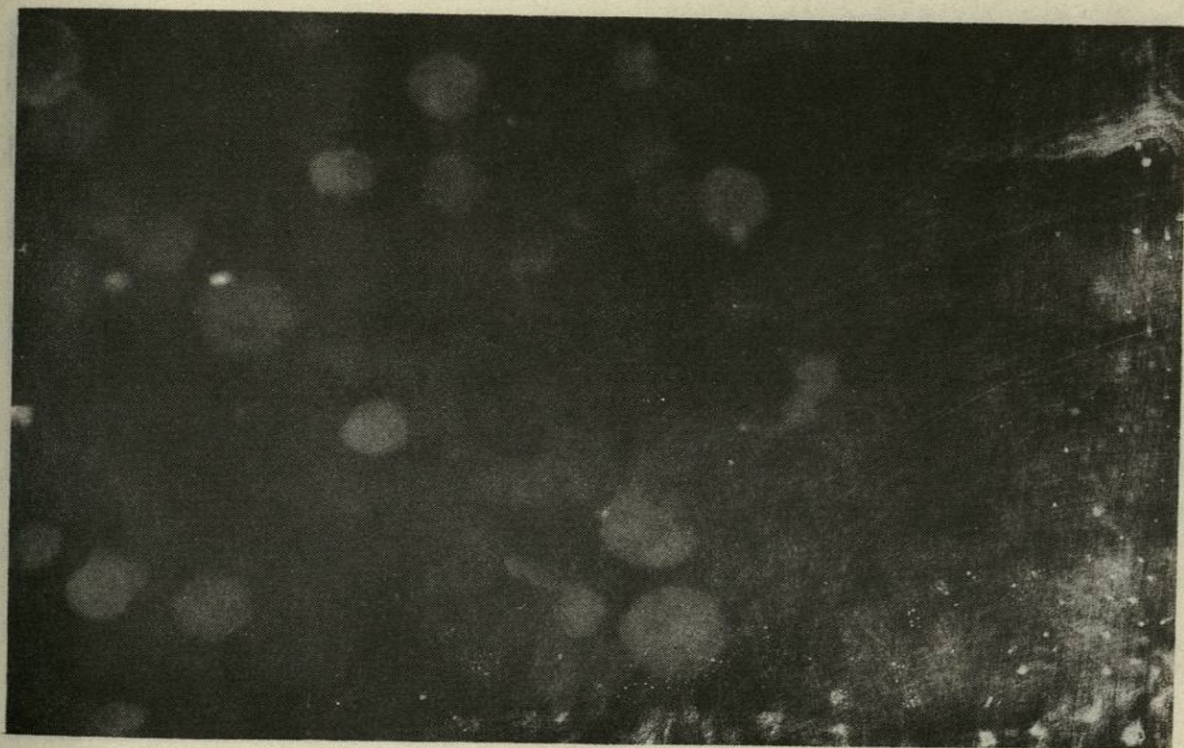


FIG. NO. 40.- Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta con trofozoítos de E. histolytica con suero total- de conejo normal (previo a la inmunización) con suero de ca- bra anti-IgG de conejo marcada con fluoresceína. (Control -- negativo). Objetivo de Inmersión.

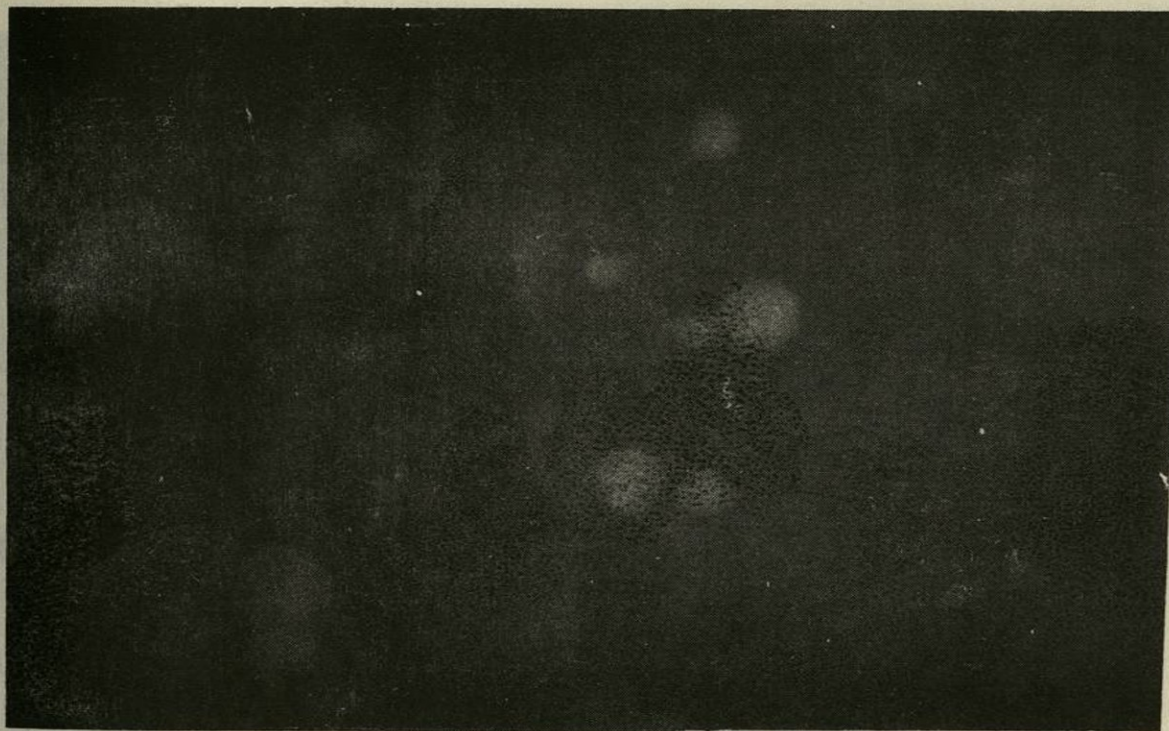


FIG. NO. 41.- Prueba de Inmunofluorescencia  
Indirecta con trofozoítos de E. histolytica con IgG normal -  
de conejo (previo a la inmunización) con suero de cabra anti  
IgG de conejo marcada con fluoresceína. (control negativo).-  
Objetivo de Inmersión.



FIG. NO. 42 .- Prueba de Inmunofluorescencia  
Indirecta con trofozoítos de E. histolytica con suero total-  
de conejo inmunizado anti-LPFG con suero de cabra anti-IgG -  
de conejo marcada con fluoresceína. Objetivo de Inmersión.

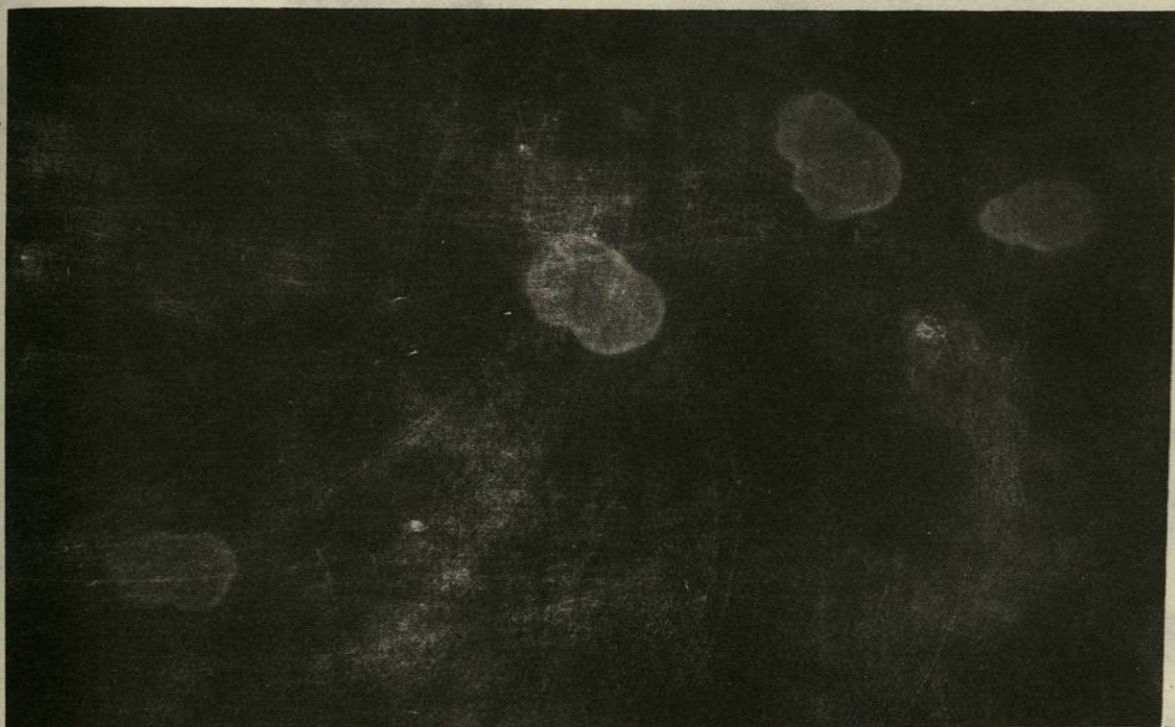


FIG. NO. 43.- Prueba de Inmunofluorescencia indirecta con trofozoítos de E. histolytica con IgG de conejo anti-LPPG con suero de cabra anti-IgG de conejo marcada con fluoresceína. Objetivo de Inmersión.

Trofozoítos de Entamoeba histolytica con suero total de conejo anti-LPPG y suero de cabra anti-IgG de conejo marcada con peróxido de rúbano. 20,300 X

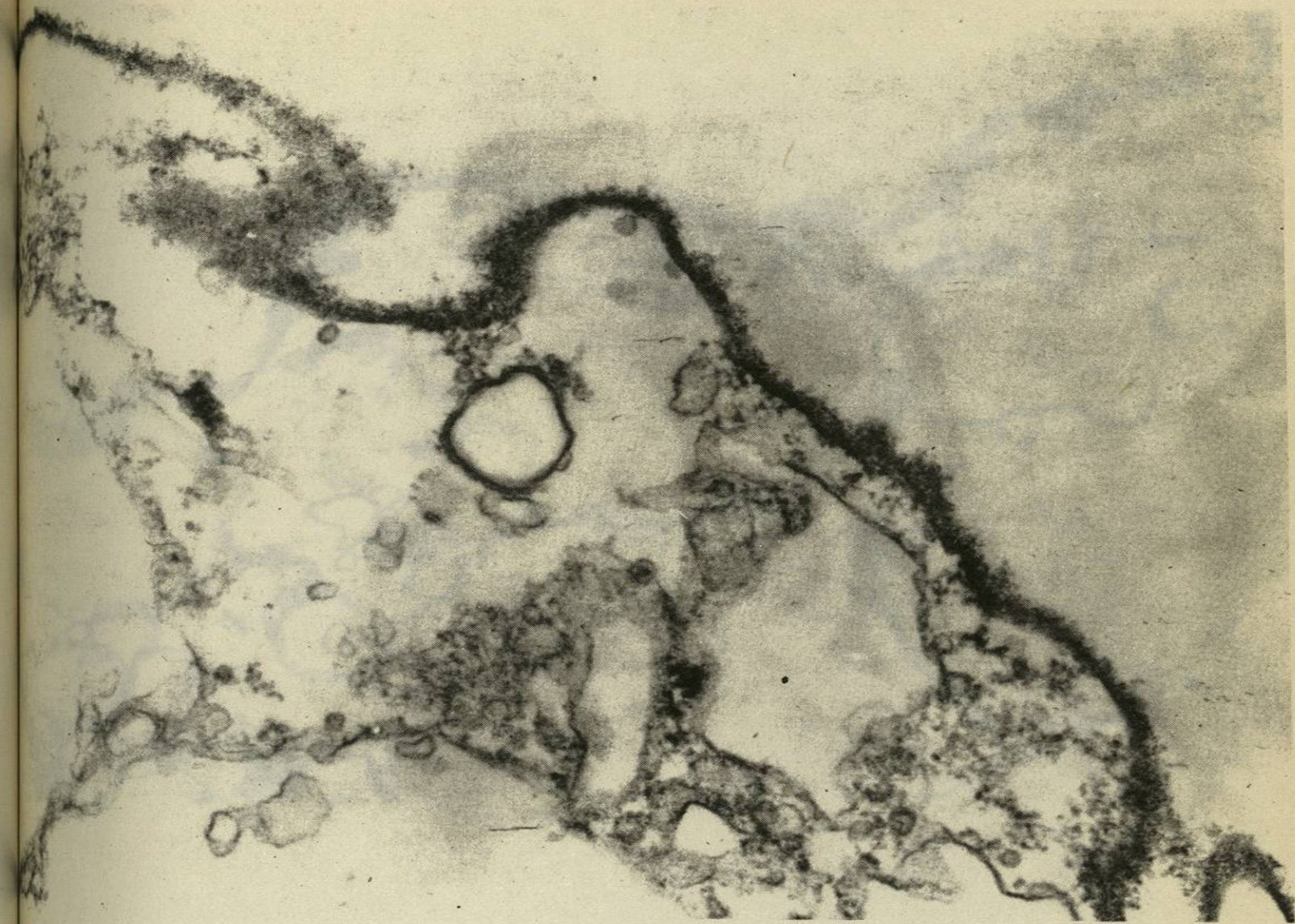


FIG. NUM. 45 .- Prueba de microscopía electrónica .-

FIG. NUM. 44 .- Prueba de Microscopía electrónica.-

Trofozoítos de Entamoeba histolytica con suero total de conejo anti-LPFG y suero de cabra anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa de rábano. 20,300 X



INCLUSIONES Y  
VIBRANCIAS

FIG. NUM.45 .- Prueba de microscopía electrónica - Trofozoítos de Entamoeba histolytica con IgG de conejo anti-- lipopéptidofosfoglicana y suero de cabra anti-IgG de conejo - marcada con peroxidasa de rábano. 20,300 X

CAPITULO V.- C O N C L U S I O N E S    Y  
S U G E R E N C I A S

1.- El método del fenol-agua utilizado para la extracción del antígeno de los trofozoítos, resultó ser el adecuado ya que permitió su separación y facilitar así identificarlo químicamente.

2.- La diferenciación química del antígeno extraído mediante la cromatografía en fase gaseosa (gas-líquido) permitió conocer la composición del antígeno lo que condujo a diferenciarlo como una LPFG.

3.- La molécula lipopolisacarídica extraída es inmunogénica a conejos, lo que facilitó la inducción de anticuerpos-específicos mediante inoculación.

4.- Las propiedades inmunogénicas de la LPFG permitió la titulación de los anticuerpos y su demostración en sueros de conejos a los que se les indujo respuesta inmune a ésta molécula mediante las técnicas inmunológicas: hemólisis pasiva, Ouchterlony y CIEP.

5.- El anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a la enzima peroxidasa de rábano mantiene sus propiedades inmunológicas para poder ser utilizado como un buen método de marcaje de proteínas, tanto internas como externas.

6.- La inmunofluorescencia indirecta y la reacción de la peroxidasa, utilizando un anticuerpo conjugado a éstas, son buenos métodos de marcaje inmunohistoquímico para la detección de antígenos.



7.- El antígeno extraído puede ser utilizado a través - de pruebas inmunológicas como la CIEF y la hemólisis pasiva- para el diagnóstico de la amibiasis invasiva así como en el diagnóstico del absceso hepático amibiano.

8.- El antígeno LPFG extraído por el método del fenol-- agua de los trofozoítos de Entamoeba histolytica se trata de un antígeno de superficie.

Toda la metodología y técnicas utilizadas en el presente trabajo arrojan el resultado final de que la LPFG es una molécula lipopolisacáridica que se encuentra localizada en - la superficie de los trofozoítos de Entamoeba histolytica de la cepa HK-9 cultivados en medio axénico, es decir, se trata de un antígeno de superficie.

Lo que ahora se deberá de tratar de encontrar es de que tipo de receptores específicos son los que intervienen en la inmovilización del parásito, qué parte de la molécula de anti cuerpo interviene en ésta, es decir, si existen receptores - para Fc ó Fab.

Es importante encontrar si ésta molécula es única de la cepa HK-9 ó si es común para los diferentes tipos de cepas - que hasta ahora han sido reportadas, y ver si la efectividad del anticuerpo es la misma para todos ó varía en potencia, - además de que posee propiedades diagnósticas ante los padeci mientos amibianos.

Por último, toda la información que al respecto se encu entre y junto con la ya existente, es seguro que se podrá -- entender mejor el proceso de la enfermedad causada por éste-

parásito y, lo más importante, poder así tratar de encontrar el antígeno que posee la mayor capacidad de estimulación antigénica y que, además, provoque una inmunización perdurable y así poderlo utilizar para el diseño de una vacuna que ayude al tratamiento de la amibiasis y entonces pensar en una posible erradicación.

CAPITULO VI.- A P E N D I C E

VI.I.1.- ABREVIATURAS

- Ac.- Anticuerpo
- AcA.- Acrilamida-agarosa
- Anti-IgG con.- Concentrado de gammaglobulina G anti-gammaglobulina G de conejo
- Anti-IgG-HRPO.- Gammaglobulina G de cabra anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa
- Aldehído-HRPO.- Peroxidasa de rábano bajo la forma de aldehído
- CIEF.- Contraimmunoelectroforesis
- DEAE-celulosa.- Dietilaminoetilcelulosa
- DAB.- Diaminobencidina
- DDSA.- anhídrido dodecenilsuccínico
- FDNB.- Fluorodinitrobenzeno
- GRCN.- Glóbulos rojos de carnero normal
- GRCS.- Glóbulos rojos de carnero sensibilizados
- HRPO.- Peroxidasa de rábano
- IDF.- Doble inmunodifusión (Ouchterlony)
- IgG-anti-LPFG.- Gammaglobulina G antilipopéptidofosfoglicana
- IgG-fluoresc.- Gammaglobulina G marcada con isotiocianato de fluoresceína
- IgGCN.- Gammaglobulina G de conejo normal

IgG-anti-LPPG.- Gammaglobulina G antilipopéptidofosfo--  
glicana

IEF.- Inmunoelectroforesis

LPPG.- Lipopéptidofosfoglicana

PBS.- Solución reguladora de fosfatos-salina

SCN.- suero de conejo normal

SCT-anti-LPPG.- Suero de conejo total anti-lipopéptido-  
fosfoglicana

Tris.- Tri-hidroximetilaminometano

VP.- Solución reguladora de Veronal más calcio y magne-  
sio.

VI.I.2.a.- PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO AXENICO

1).- Composición del medio nutritivo:

Tripticasa .....	2 gr
Extracto de levadura .....	1 gr
Glucosa .....	1 gr
Cloruro de sodio .....	200.00 mgr
Fosfato de potasio monobásico monohidratado .....	60.00 mgr
Fosfato de potasio dibásico anhidro .....	100.00 mgr
Hidrocloruro de L-cisteína monohidratado .....	100.00 mgr
Ac. L-ascórbico .....	20.00 mgr
Citrato férrico amónico .....	2.28 mgr
Agua tridestilada (en material de vidrio) .....	cbp 87.00 ml

Disuélvase todos los reactivos en el orden presentado - en aproximadamente 50 ml de agua tridestilada y complétese - el volúmen a 87 ml y ajústese el pH a 6.8 con NaOH 1 N.

Para clarificar la solución fíltrese a través de un papel filtro Watman del No. 1 usando un embudo Büchner y bomba de succión.

2).- Composición y preparaciónde la mezcla vitamínica - Tween 80 usada.

Solución stoch:

a).- Mezcla vitamínica 107

b).- Vitamina B<sub>12</sub>

Disolver 40 mgr en agua destilada y complétese el volúmen a 100 ml.

c).- ác. tióctico

Disolver 100 mgr en alcohol etílico absoluto y completar el volúmen a 100 ml.

d).- Tween 80

Disolver 50 mgr en alcohol etílico absoluto y completar el volúmen a 100 ml.

SOLUCION DE TRABAJO:

A 100 ml de (a) adicionar 12 ml de (b), 4 ml de (c), 4 ml de (d) y 180 ml de agua tridestilada. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C. Pasar la mezcla através de un filtro - Nucleopore de 0.22 micras y guárdese en refrigeración a 4°C en pequeñas porciones.

3).- Preparación del medio TYI-S-33

A cada gramo del medio TY adicionar bajo condiciones --asépticas 3 ml de la mezcla vitamínica Tween 80 y de 10 a 15 ml de suero bovino.

Para mantener en condiciones asépticas y axénicas el --medio, úsense tubos de vidrio de 16 x 125 mm de vidrio borosilicato con tapón de rosca, para cultivación masiva, matraces Micro-Fernbach de 125 ml de capacidad.

No se recomienda utilizar material desechable ó de plástico. Se sugiere colocar volúmenes de 14 ml de medio si se -cultiva en tubos, 120 ml en matraces Micro-Fernbach.

Preparación de la mezcla vitamínica 107

1).- Vitaminas B hidrosolubles.- Solución a: 62.5 mgr - de niacina, 125 mgr de ác. p-aminobenzoico. Disolver en agua hirviente y completar el volúmen a 150 ml.

Solución b: 62.5 mgr de niacinamida , 62.5 mgr de hidrocloruro de piridoxina, 62.5 mgr de hidrocloruro de piridoxal,

25 mgr de hidrocioruro de tiamina, 25 mgr de pentotenato de calcio, 25 mgr de inositol, y 1250 mgr de cloruro de colina. Disolver en agua destilada y completar el volúmen a 150 ml.

Solución c: 25 mgr de rivoilavina se adicionan a 75 ml- de agua destilada y con la ayuda de NaOH 0.1 N adicionando - gota a gota. Completar el volúmen a 100 ml.

Las soluciones a, b, y c se combinan y se completa el-- volúmen a 500 ml con agua destilada.

2).- Solución de biotina.- 30 mgr de D-biotina se disuelven en 200 ml de agua destilada con la ayuda de NaOH 0.1 N y se completa el volúmen a 300 ml.

3).- Solución de ác. fólico.- 30 mgr de ác. fólico se - disuelven en 200 ml de agua destilada con la ayuda de NaOH - 0.1 N y el volúmen total se completa a 300 ml.

4).- Vitaminas A,D y K liposolubles.- Solución a: 300 - mgr de vitamina D (calciferol) se disuelven en 63 ml de etanol de 95 % v/v.

solución b: 60 mgr de vitamina K (bisulfito de sodio y menadiona) se disuelven en 300 ml de una solución acuosa de Tween 80 al 5 % v/v.

Se combinan la solución b con la solución a y se completa el volúmen con agua destilada a 3000 ml.

5).- Solución de vitamina E.- Disolver 25 mgr de vitamina E (acetato de alfa-tocoferol) en 250 ml de agua destilada.

La mezcla vitamínica de trabajo se prepara por la combinación de las 5 soluciones stoch en las proporciones siguientes: 500 ml de la solución de vitaminas B hidrosolubles, 250 ml de la solución de biotina, 250 ml de la solución de ác. - fólico, 2500 ml de la solución de vitaminas A,D y K liposolubles y 250 ml de la solución de vitamina E. Esterilizar a --



170 libras de presión pasando previamente la solución a través de un filtro bacteriológico Selas # 03. Guardar a  $-22^{\circ}\text{C}$ .

Un desarrollo de turbidez es indicativo de que se agregó un exceso de hidróxido de sodio del utilizado para preparar las soluciones stoch 1c, 2 ó 3.

#### VI.I.2.b.- ESTANDARIZACION DE GLOBULOS ROJOS DE CARNERO

Se lavaron glóbulos rojos de carnero tres veces ( dos veces con PBS pH 7.2 y la tercera con VP pH 7.2). Después de la última lavada se tomaron 0.4 ml de los glóbulos rojos y les fué agregado 19.6 ml de VP. Esta suspensión está al 2 % Posterior a una agitación, a fin de obtener una suspensión homogénea, se tomaron 0.6 ml de la misma y se les agregó 1.4 ml de agua destilada con lo que se observa una hemólisis total, se analiza espectrofotométricamente a una densidad óptica de 550 nm. La lectura obtenida deberá ser de 0.5 la que indicará una hemólisis total. Si la lectura no es la deseada deberá aplicarse la siguiente relación:

$$DO_1 \cdot V_1 = DO_2 \cdot V_2$$

DO 1 = lectura obtenida del hemolizado

V 1 = volúmen de 20 ml

DO 2 = 0.500 (lectura estándar)

V 2 = volúmen buscado

$$V_2 = \frac{(DO\ 2) (V\ 1)}{(DO\ 2)}$$

V 2 = volúmen en el cual la suspensión de glóbulos rojos de carnero ofrece una lectura de 0.5, es decir, se logra

una hemólisis total.

VI.I.2.c.- TITULACION DE COMPLEMENTO DE COBAYO

Se sangra un cobayo por punción cardiaca, y la sangre recolectada deberá mantenerse en una temperatura de 4°C. Se separa el suero de la sangre una vez coagulada por centrifugación a 2000 rpm por 15 min. La centrifugación deberá hacerse a 4°C. Una vez separados deberá alicuotarse en viales de 1 ml y mantenerse en congelación.

De la suspensión de glóbulos rojos de carnero estandarizados se toman 15 ml, a la cual se le agregan 15 ml de hemolisina comercial diluída 1:6000 en VP pH 7.2. Esta suspensión se coloca en baño de agua a 37°C durante 30 min.

Se deberán hacer diluciones del complemento de cobayo de 1:50, 1:200, 1:250 y 1:300. La metodología se explica en la figura no. 46.

A todos los tubos se les agrega 0.50 ml de VP frío para detener la reacción. Cada uno de los tubos se centrifuga a 1500 rpm durante 15 min y se efectúa análisis espectrofotométrico a cada uno de los tubos a 550 nm de densidad óptica.

Con las lecturas obtenidas se grafican los resultados-- en papel logarítmico y se calcula en la gráfica 1 UH<sub>50</sub> % (Unidad hemolítica) y se hace con relación a 1 ml de complemento de cobayo. El resultado se multiplica por la dilución y-- éste resultado es el título del complemento, aplicando la -- siguiente regla:

X ml . . . . . 1 UH 50%  
1 ml . . . . . y UH<sub>50</sub> %

No. de tubo	VP ( ml )	C' ( ml )	GRCS ( ml )	INCUBAR A 37°C 30 MINUTOS BAÑO Ma.	VP ( ml )	
Dil. 1:200						
1	0.40	0.50	0.60		0.50	
2	0.55	0.35	0.60		0.50	
3	0.65	0.25	0.60		0.50	
4	0.75	0.15	0.60		0.50	
Dil. 1:250						
5	0.40	0.50	0.60		0.50	
6	0.55	0.35	0.60		0.50	
7	0.65	0.25	0.60		0.50	
8	0.75	0.15	0.60		0.50	
Dil. 1:300						
9	0.40	0.50	0.60		0.50	
10	0.55	0.35	0.60		0.50	
11	0.65	0.25	0.60	0.50		
12	0.75	0.15	0.60	0.50		
Testigos						
T <sub>1</sub>	0.90		0.60	0.50		
T <sub>2</sub>			0.60	1.40		

Fig.No.46.- Titulación de Complemento.

Campbell. Métodos Inmunológicos.- Ed. Addison-Wesley  
Publishing Co. Inc. 1977

Titulo del complemento: Y UH<sub>50</sub> % dilución

VI.I.2.d.- ACTIVACION DE DEAE-celulosa

1.- Pesar de 10 a 15 gr de DEAE-celulosa (0.6-0.9 meq/gr). Como regla general se utiliza 1 gr de DEAE-celulosa seco por cada 30 mgr de proteína.

2.- Suspender la celulosa seca en un matríz con 500 ml de HCl 0.5 N y agitar suavemente por 5 min. Permitir que la celulosa sedimente.

3.- Remuévase el sobrenadante y las partículas sin sedimentar por succión a través de un tubo unido a un aspirador y agréguese 500 ml de agua destilada con agitación por 5 minutos.

4.- Prepare un embudo Büchner con papel filtro Watman del No. 1 y lave la celulosa con agua destilada hasta que el pH del agua de lavado sea de 5.

5.- Colocar la celulosa en otro matríz y remuévase la que queda en el papel filtro por medio de una corriente de agua destilada.

6.- Deje sedimentar la celulosa. Elimine el sobrenadante por aspiración y agregar 500 ml de NaOH 0.5 N y agitar cuidadosamente por 30 min.

7.- Lávese nuevamente con agua destilada hasta que el pH del agua de lavado sea aproximadamente de 5.

8.- Cuando el pH del agua de lavado sea de 5, se lava con solución reguladora que se vaya a utilizar en la elusión de la proteína.

9.- Lávese por tres veces con la solución reguladora requerida. Una vez obtenido el pH de la solución, la celulosa-

se suspende en 200 ml del regulador y se guarda a 4°C.

#### VI.I.2.e.- PREPARACION DE LA MEMBRANA DE DIALISIS

Se toma la cantidad necesaria de cinta de colodión, según sea el volúmen de la solución que se vaya a dializar, y se mantiene en agua a ebullición por 30 min. Obturar uno de los extremos a modo de que no permita la salida de la solución a dializar. Llenése con el producto obtenido y ciérrase de la forma más segura como sea posible a modo de que no permita fugas de la solución a dializar.

Dialice contra la solución reguladora requerida por el tiempo necesario, según sea el caso.

#### VI.I.2.f.- DETERMINACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS. METODO DE LOWRY

Reactivos:

1.- Referencia de proteína: 0.50 mgr/ml (BSA)

2.- Reactivo A: carbonato de sodio en hidróxido de sodio 0.1 N.

3.- Reactivo B: sulfato de cobre pentahidratado al 0.5% en tartrato de sodio ó de potasio al 1 %.

Preparar una mezcla de partes iguales del reactivo A y B.

4.- Reactivo C: Mezcla de 50 ml del reactivo A con 1 ml del reactivo B.

5.- Reactivo de Folín-Cicalteu (Ac. fosfomolibdico-fosfotúgstico). Antes de utilizarse debe diluírse 1:3 v/v en agua destilada.

TUBO	PROT. (mgrs)	REFER. ( ml )	S.SAL. ( ml )	R. C ( ml )		R. D ( ml )	
1	0.01	0.02	0.38	2.00	MEZCLAR Y REPOSAR 10 MIN.	0.20	MEZCLAR CON VORTEX Y REPOSAR 30 MIN.
2	0.02	0.04	0.36	2.00		0.20	
3	0.03	0.06	0.34	2.00		0.20	
4	0.05	0.10	0.30	2.00		0.20	
5	0.10	0.20	0.20	2.00		0.20	
6	0.15	0.30	0.10	2.00		0.20	
7	0.20	0.40		2.00		0.20	
T <sub>1</sub>			0.40	2.00		0.20	
T <sub>2</sub>			0.40	2.00		0.20	
10	DILUCIONES			2.00		0.20	
11	DE			2.00		0.20	
12	PROTEÍNA			2.00		0.20	
13	PROBLEMA			2.00		0.20	

Fig. No. 47.— Determinación Cuantitativa de Proteínas. Método de Lowry. J.Biol. Chem. 193:265, 1951

Curva de calibración:

Se sugiere hacerla por duplicado y a concentraciones - entre 0.01 y 0.20 mgr/ml de proteína (BSA). Deben de hacerse lecturas de absorbancia a 600 nm ó 750 nm para muestras que contengan menos de 125 microgramos de proteína por mililitro. Para soluciones concentradas pueden hacerse las lecturas cerca de los 500 nm. Si para la solución problema se obtienen-- lecturas mayores de 2, deberá diluirse la muestra.(Fig. No.- 47).

VI.I.2.g.- DOSIFICACION DE AZUCARES. METODO DE LA ANTRONA (234)

Reactivos:

- 1).- Solución de ác. sulfúrico al 78 %
- II).- Solución de antrona al 0.20 % en ácido sulfúrico- p/v.
- III).- Soluciones estándar de azúcares: glucosa, galactosa y manosa al 1 mgr/ml

Técnica:

Trabajar en tubos Rodés.

- 1.- Colocar en cada tubo 1 ml de antrona
- 2.- Colocar los tubos en un baño de hielo
- 3.- Agregar de 1 a 100 microlitros de las soluciones -- estándar.
- 4.- Completar el volumen de cada tubo a 100 microlitros con agua bidestilada y agitar con Vortex.
- 5.- Colocar los tubos en un horno de calor seco a 100°C durante 10 min.
- 6.- Sacar los tubos una vez transcurridos los 10 min y-

colocarlos en un baño de hielo.

7.- Efectuar análisis espectrofotométrico a 625 nm de densidad óptica, a cada uno de los tubos utilizados.

VI.I.2.h.- COLORACION Y DECOLORACION DE PLACAS DE IEF  
Y CIEF

Colorante:

Negro de amido(Amido Black)	. . . .	2.5 grs
Alcohol etílico al 90 %	. . . .	225 ml
Ac. acético glacial	. . . .	50 ml
Agua destilada	. . . .	225 ml

Decolorante:

Ac. acético glacial	. . . .	100 ml
alcohol etílico absoluto	. . . .	500 ml
Agua destilada	. . . .	400 ml

Una vez efectuado el proceso de electroforesis, deberá de seguirse la siguiente metodología de teñido de placas.

1.- La placa deberá lavarse con una solución de cloruro de sodio al 0.9 % por dos días manteniendo una temperatura de 37°C. El lavado puede hacerse también en una solución al 5 % por un día a la misma temperatura.

2.- Una vez lavada con la solución de cloruro de sodio se efectúa un segundo lavado con agua destilada a la misma temperatura por un día. Se efectúan los cambios que sean necesarios.

3.- Teñido: la placa se coloca en un porta placas y se coloca en una cubeta de teñido con el colorante. El baño con



el colorante es mantenido por 30 min.

4.- Decoloración: una vez teñida, se elimina el exceso de decolorante mediante un chorro de agua y se coloca en la cubeta de decoloración. Deberán efectuarse dos ó más cambios.

5.- Secado: la placa una vez lavada, teñida y decolorada se coloca entre papel filtro Watman del no. 1 a modo de que absorba el agua del gel. El procedimiento de secado se puede acelerar colocando la placa en una estufa de calor seco. Una vez efectuado, se podrán observar fácilmente las bandas de precipitación.

VI.I.2.i.- PREPARACION DE LA SOLUCION REGULADORA PBS  
pH 7.2

Cloruro de sodio	. . . .	200.00 gr
Fosfato monobásico de sodio dihidratado	. . . .	39 gr.

ó

Fosfato de sodio dibásico monohidratado	. . . .	34.5 gr
--	---------	---------

Diluir en 5 lts de agua destilada y ajustar el pH a ---  
6.8 con NaOH 8N.

Para utilizarse deberá diluirse 1:5 con agua destilada y ajustar el pH a 7.2 con NaOH 8 N.

VI.I.2.j.- SOLUCION REGULADORA VP pH 7.2

cloruro de sodio	. . . .	212.5 gr
Dietil barbiturato de sodio (barbital sódico)	. . . .	9.375 gr
Ac. dietilbarbitúrico	. . . .	14.375 gr

Diluir en 1 lt de agua destilada. Posteriormente agregar:

12.5 ml de cloruro de magnesio 1 M

12.5 ml de cloruro de calcio 0.3 M

Calentar si es necesario y ajustar el pH a 6.8 con NaOH 8 N y diluir a 5 lts con agua destilada. Para ser utilizado debe diluirse 1:5 en agua destilada y ajustar el pH a 7.2 -- con NaOH 8 N.

VI.I.2.k.- REGULADOR DE COCODILATO DE SODIO 0.2 M pH 7.4

Cocodilato de sodio . . . . 42.8 grs

Agua destilada cbp . . . . 1000 ml

Antes de aforar al volúmen total se ajusta el pH con ác. clorhídrico 0.2 M.

VI.I.2.l.- REGULADOR BARBITAL SODICO

Ac. 5,5-dietilbarbitúrico . . . . 2.76 gr

5,5-dietilbarbiturato de sodio

(barbital sódico) . . . . 15.40 gr

Disolver en un volúmen de 1 lt de agua destilada. El pH de la solución deberá ser de 8.6.

VI.I.2.m.- REGULADOR Tris-HCl 0.05 M

Tris (0.05 M) . . . . . 24.23 gr

Agua destilada cbp . . . . . 1000 ml

Solución B:

HCl 30 % ( 0.1 M ) . . . . . 30.42 ml

Agua destilada cbp . . . . . 219.58

Dilúyase 1:10 para ser utilizada.

Mézclense 250 ml de la solución a y 400 ml de la solución B. Aforar a 1 lt. El pH de la solución será de 7.6.

VI.I.2.n.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS (GAMMAGLOBULINAS)

Deberán prepararse diferentes diluciones de la solución original de la proteína si ésta dá una lectura mayor, en el espectrofotómetro, de 2.

Para obtener la concentración de proteína en la solución se aplica la siguiente regla:

$$\text{mgr} = \frac{\text{DO} \cdot \text{dilución} \cdot 10 \cdot 1}{\text{C.E.}}$$

DO.- Valor obtenido en el espectrofotómetro

C.E.- coeficiente de extinción de la proteína  
(stándard)

CAPITULO VII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Isibasi, A., et. al. : Chemical composition and biological activities of a phenol-water extract from an *E. histolytica* axenic culture. 4th International Congress of Immunology - Abstracts, Paris. 12:5-14, 1980.
- 2.- Isibasi, A. et. al. : Polisacáridos obtenidos de *E. histolytica* en cultivo axénico. Memorias de la Conferencia Internacional sobre amibiiasis. IMSS. 82-87, 1976
- 3.- Sánchez-Márquez, N. et. al. : Serología con polisacáridos de *E. histolytica*. Arch. Inv. Méd. (Méx) 9 (Supl 1): 285-290, -- 1978.
- 4.- Freeman, G.G. : The preparation and propiedades of a specific polisaccharide from *Bacterium typhosum* Ty2. J. Biochem. 36:340, 1942
- 5.- Staub, A.M. : Methods in carbohydrate chemistry (R.L. Whistler and M.L. Wolfrom, eds.) Academic Press, N.Y. Vol V; 93, 1965.
- 6.- Galanos, C., et. al. : A new method for the extraction of R lipoly-saccharides. Europ. J. Biochem. 9:245-249, 1969
- 7.- Korn, D.E. et. al. : Macromolecular composition of an amoeba plasma membrane. J. BIOL. CHEM. 248:439, 1969
- 8.- Isibasi, A. et. al. : Inmunoquímica de una Lipopéptido fosfoglicana extraída de trofozoítos de *E. histolytica* cepa - HK-9 cultivados en medio axénico utilizando el método del fenol-agua. Arch. Invest. Méd. (Méx). En impresión.
- 9.- Neal, R.A. : Pathogénesis of amoebiasis. J. Br. Soc. Gastroent-Gut 12:483, 1971
- 10.- Neal, R.A. : Pathogénesis of amoebiasis. In: Clinical Tropical Medicine. ed. 2 Cahill, K.M. (Ed) Baltimore, University Park Press 2:134, 1972
- 11.- Bos, H.J. : The problem of pathogenicity in parasi --

- tic entamoeba. Thesis. University of Leiden, 1973
- 12.- Neal, R.A.: Pathogenesis of amebiasis. Gut 12:483-486, 1971
  - 13.- Maddison, S.E. et al.: Reactivity of human immunoglobulins in amebiasis. J. Immunol. 100:(1):217-226, 1968
  - 14.- Flores-Barroeta, F. et al.: Observaciones sobre amebiasis en material de autopsia. Estudio de 109 casos. Pre. Med. Mex. 24:141, 1959
  - 15.- Neal, R.A. et al.: Strain variation in *E. histolytica* Parasitol. 45:152, 1955
  - 16.- Beauer, J.C. et al.: Experimental *E. histolytica* infection in man. Am. J. Trop. Med. Hyg. 5:1000, 1956
  - 17.- Biagi-F, F. et al.: Quimioprofilaxis de la amebiasis con cefamida en una comunidad abierta. Gac. Méd. Méx. 96:183, 1966
  - 18.- Biagi-F, F.: Algunas observaciones clínicas sobre 46 casos de amebiasis en niños. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 17:62, - 1958
  - 19.- Biagi-F, F. et al.: Amibiasis: un reto a la comprensión de los mecanismos patogénicos. Gac. Méd. Méx. 97:69, 1967
  - 20.- Biagi-F, F. et al.: Cutáneo amebiasis in México -- Dermatol. Trop.: 2:129, 1963
  - 21.- Acevedo-O, A. et al.: amebiasis cervicouterina. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 4:338, 1962
  - 22.- Eaton, R.D.P. et al.: A surface-active lysosome in *E. histolytica*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hig. 63:678, 1969
  - 23.- Proctor, E.M. et al.: The observatio of a surface-active lysosome in the trophozoites of *E. histolytica* from the human colon. Ann. Trop. Med. Parasitol. 66:339, 1972
  - 24.- Treviño-García Manzo, N. et al.: Lisosomas en *E. histolytica* Arch. Inv. Med. Méx. 2, Supl. 1:179, 1971
  - 25.- El-Hashimi, W.K. et al.: Ultrastructure of *E. histolytica* trophozoites obtained from in vitro cultures. Amer. J. Trop Med. Hig. 19:215, 1970

- 26.- Magauda, P.L. et.al.: Research into the morphology - of *E. histolytica*. Riv.Parasit. 31:237,1970
- 27.- Griffin, J.L.: Human amebic dysentery. Amer.J.Trop.- Med.Hyg. 21:215,1970
- 28.- Eaton, R.D.P., et.al.: The functional morphology of -- pathogenicity in *E. histolytica*. Ann.Trop.Med.Parasit. 64:299 1970
- 29.- Miller, J.H. et.al.: The mode of action of surface - lysosomes of *E. histolytica* in human infection. (Ed) Baton -- Rauge, Clairtors Publishing Div. p.152,1972
- 30.- Brand, H. et.al.: Pathology of human amebiasis. Hu - man Pathology 1:351,1970
- 31.- Kagan, I.G.: The immunology of amebiasis. Arch.Inv. - Méd.(mex) 4, supl. 1:169,1973
- 32.- Stamm, W.P.: *E. histolytica* in man. In: The pathology of parasitic diseases. Taylor, A.E.R.(ed). Oxford, Blackwell -- Scientific Publ. 4:1,1966
- 33.- Pittman, F.E. et.al.: Studies on human amebiasis. - Gastroenterology 65:581,1973
- 34.- Das, S.R. et.al.: Immunological studies on amoebia - sis. Trans.Roy.Trop.Med.Hyg. 64:472,1970
- 35.- Pinto Da Silva, P. et.al.: Membrane structure and -- surface coat of *E. histolytica*. J.Cell.Biol. 64:538,1975
- 36.- Bailey, C.P. et.al.: Localization of Lipophosphono - glycan in membranes of *A. castellanii* by using specific anti- bodies. Molecular and Cellular Biology Vol.1, 4:358,1981
- 37.- Bowers, B. et.al.: Localization of lipophosphonogly - can on both sides of *Acanthamoeba* plasma membrane. J.Cell.Biol. 62;533,1974
- 38.- Korn, E.D. et.al.: Lipophosphonoglycan of the plasma - membrane of *Acanthamoeba castellanii*. J.BICL.Chem 24(11)3335, - 1974 .

- 39.- Dearborn,D.G.et.al.: Lipophosphonoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*.*J.BiolChem.*249(11): - 3342,1974
- 40.- Korn,E.D. et.al.: Macromolecular composition of amoeba plasma membrane.*J.Biol.Chem.*248(2):439,1973
- 41.-Craig,C.F.:Amebiasis an Amebic Dysentery. Charles C. Thomas, Springfield Illinois.p.315,1934
- 42.- Deschiens,R. 1939. Le pouvoir pathogènes des amibes dysenteriques en culture, ses relations avec l'enkystement. - Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique et de ses Filiales.
- 43.- Anderson,H.H. et.al.: Amebiasis: Pathology, diagnosis and chemotherapy. Springfield.Charles C.Thomas.233,1953
- 44.- Passarelli,N.: Chronic ulcerative colitis, introduction to its study. *Arq.Bras.Med.* 50(55):82,1960
- 45.- Conway,H. et.al.: Indigenous amoebic colitis on routine biopsies from rectum and sigmoid colon. *Br.J.Med.*1:362, 1962
- 47.- Gilman,R.H. et.al.: Acute intestinal amoebiasis - proctoscopic appearances with histopathological correlation. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 65:359,1971
- 48.- Juniper,K.Jr.: Parasitic diseases of the intestinal tract.Chap. 24. Gastroenterology Medicine Ed.by M.Paulson. -- Philadelphia,Lea and Febiger,1969
- 49.- Juniper,K.Jr.: et.al.:Rectal biopsy in the diagnosis of amebic colitis.*South.Med.J.* 51:545,1958
- 50.- Prathap,K. et.al.: The histopathology of acute intestinal amebiasis. *Am.J.Pathol.* 60:229,1970
- 51.- Wruble,J.D. et.al.: Toxic dilatation of the colon - in a case of amebiasis. *N.Engl.Med.*275:926,1966
- 52.- Sodeman,W.A.Jr.: Amebiasis.*Am.J.Dig.Dis.*16:51,1971
- 53.- Wolff,W.I. et.al.: colonofiberoscopy. A new method and valuable diagnostic modality. *Am.J.Surg.*123:180,1972



- 54.- Ishizaka, K. et.al.: Comunication to editor. J.Immu--  
nol. 97:75,1966
- 55.- Franklin, E.C.: Comunication. Prog.Allerg.8:58,1964
- 56.- Funderberg, H.H.: Comunication to editor. Ann.Rev. -  
Microbiol. 19:301,1965
- 57.- Fahey, J.L.: J.A.M.A. 194:71,1965
- 58.- Fahey, J.L.: Comunication. 194:255,1965
- 59.- Schon, A.H.: Molecular and Cellular Basis of antibo-  
dy formation. Edited by: J.Sterzl et.al.p.227 Academic Press,-  
Inc, N.Y., 1965
- 60.- Maddison, S.E.: et.al.: Reactivity of human Immunoglo-  
bulins in amebiasis. J.Immunol.100(1):217,1968
- 61.- Perelmutter, L.: Comunication to editor. J.Immunol.-  
Allerg. 37:236,1966
- 62.- Kessel, J.F. et.al.: Comunication. J.Amer.Trop.Med.-  
14:540,1965
- 63.- Maddison, S.E. et.al.: Comunication. Amer.J.Trop.Med.  
14:551,1965
- 64.- Milgram, E.A. et.al.: comunication to editor. Gastro  
enterology 50,645,1966
- 65.- Maegraith, B.G. et.al.: comunication. Ann.Trop.Med.-  
Parasit. 49:434,1954
- 66.- Kagan, I.G. et.al.: comunication on amoebiasis. Am.J.  
Trop.Med. In press.
- 67.- Smith, R.T. et.al.: Amoebiasis in childrens. Pediatrics  
33:163,1964
- 68.- Freeman, M.J.: Amoebiasis. J.Immunol. 95:981,1965
- 69.- Gynes, L. et.al.: Allergy in amoebiasis. Arch. Aller.  
29:106,1964
- 70.- Ishizaka, K. et.al.: Amoebiasis. J.Allerg. 37,135, -  
1966
- 71.- Perelmutter, L. et.al.: Amoebiasis. Arch.Aller.19: -  
129,1961
- 72.- Rifkind, R.A. et.al.: Use of ferritin-conjugated --

antibody to localize antigen by electron microscopy. ---  
Nature 187(4793):1094,1960

73.- Tawde, S.S. et.al.: Conjugation of antibody to ferritin by means of p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodiphenylsulphona --  
Arch.Biochem.Bioph. 97(2):430,1962

74.- Vickerman, K. et.al.: Localization of variable antigens in the surface coat of Trypanosoma brucei using ferritin conjugated antibody. Nature 224,1125,1969

75.- Nakane, P.K. et.al.: Enzyme-labeled antibodies. J. -  
Histochem.Cytochem 14(12):929,1967

76.- Auromeas, S. et.al.: Peroxidase labelled antibody --  
and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. -  
Immunochem 8:1175,1971

77.- Nakane, P.K. et.al.: Peroxidase labelled antibody. --  
J.Histochem.Cytochem 22(12):1084,1974

78.- Weir, E.E. et.al.: a more sensitive and specific histochemical peroxidase stain for the localization of cellular-antigen by the enzyme-antibody conjugated method. J.Histochem.Cytochem. 22(12):1135,1974

79.- Weitz, B.G.F.: amoebiasis. Nature 185:788,1960

80.- Weitz, B.G.F.: Communication to editor. J.Gen.Microbiol. 23:589,1960

81.- Miller, J.K.: Amoebiasis. J.Immunol. 9:521,1965

82.- Harris, W.G. et.al.: Cellular sensitivity in amoebiasis. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 70(4):340,1976

83.- Desowitz, R.S.: antiparasitic mechanism in parasitic infections. Technical Reviews. Second International Congress of Parasitology p.521, 1979

84.- Izar, G.: Studien über Amoebenenteritis. Arch.f. ---  
Schiffs und Tropen-Hygiene 18:45,1974

85.- The origin of antigenic abstances in E. histolytica Schaudin and serologic manifestation of their antibody inducing properties J.Parasitol. 43:124,1962

- 86.- Augustine,R.: Amoebiasis. Acta.Allerg. VII(Supl): -  
31,1960
- 87.- Anderson,R.K. et.al.: Amoebiasis. Science 143:1334,  
1964
- 88.- Layton,L.L. et.al.: Amoebiasis. Nature(London) ----  
193:988,1968
- 89.- Elsdon-Dew,R.: The epidemiology of amoebiasis. Adv.  
Parasitol. 6:1,1968
- 90.- Kagan,I.G.: The immunology of amoebiasis. Arch.Inv.  
Méd.(mex) 5(2):457,1974
- 91.- Krupp,I.M.: Antibody reponse in intestinal and ex--  
traintestinal amoebiasis. J.Trop.Med.Hyg. 19(57):57,1970
- 92.- Ortiz-Ortiz,L. et.al.: Cellular hipersensitivity in  
amoebiasis.Arch.Inv.Méd.Méx. 5(2):481,1974
- 93.- Shaffer,J.G. et.al.: Amoebiasis, a biomedical pro--  
blem. Illinois,U.S.A., Charles C. Thomas, 1965
- 94.- Harris,W.G. et.al.: Cellular sensitivity in amoebia  
sis. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 70(4):340,1976
- 95.- Savanat,T. et.al.: Amoebiasis. Am.J.Trop.Med.Hyg. -  
22(6):705,1973
- 96.- Immunology in host-parasite relationships. Response  
to parasites. Amoebiasis. Illinois,U.S.A., Charles C.Thomas,-  
1968
- 97.- Ivady,G.R. et.al.: Weitere Erfahrungen bei der Bahan  
dlung der intertitieller plasma cellulären. Pneumonie mit Pen  
tamidín. Monatschr.Kinderh. 111:297,1963
- 98.- Levine,N.D.: Protozoan parasites of domestic animals  
and man. Burgess, Mineápolis,1961
- 99.- Manwell,R.D.: Introduction to protozoan and proto -  
zoology. St. Martin's Press,N.Y.,1961
- 100.- Marcial-Rojas,R.A.(ed): Pathology of protozoal and  
herminthive diseases. William and Wilkins, Baltimore,1971

- 101.- Levine, N.D.: Problems in the sistematics of the +- "sporozoa" J.Parasitol.Protozool. 8:442,1961
- 102.- Chandler, A.C. et.al.: Introduction to parasitology John Wiley and Sons, N.Y., 1961
- 103.- Faust, E.C. et.al.: animal agents and vectors of -- human diseases. Lea and Bebiger. Philadelphia, 1968
- 104.- Faust, E.C. et.al.: Clinical parasitology. 7th ed. - Lea and Febiger, Philadelphia, 1962
- 105.- Hull, T.G. Charles C. Thomas. Sprinfield Illinois - 1962.
- 106.- Mc Coy O.R., et al.: Epidemic amebic dysentery. Na tional Institutes of Healt Bulletin. No. 116, 1936
- 107.- Offut, A.C. et.al.: A water borne outbreak of ame-- biasis. Amer. J. Pub. Hlth. 45:486, 1955
- 108.- Burrows, R.B.: Morfological differentiation of E. - hartmanni and E. polecki fron E. histolytica. Amer.J.Trop.Med. Hyg. 8:312, 1959
- 109.- Burrows, R.B.: Microscopic diagnosis of the parasi- tes of man. Yale University Press, New Haven, Conn, 1965
- 110.- Proctor, E.M. et.al.: The observation of a surface- active lysosome in the trophozoites of E. histolytica from -- the human colon. Ann.Trop.Med. Parasitol. 66(3):339, 1972
- 111.- Barker, D.C. et.al.: The chromatoides bodies of E.- invadens. Expl.Cell.Res. 15:604, 1958
- 112.- Lowe, C.Y. et.al.: Further electron microscopie stu dies of E. histolytica. Trans.Roy.Trop.Med.Hyg. 63:11, 1969
- 113.- Lowe, C.Y. et.al.: electron microscope of E. histo- lytica. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 62:465, 1968
- 114.- Bird, R.G.: Studies on amoebiasis including the --- morphology an behaviour of certain parasitic amoebae of man - and animals. Ph.D.Thesis, Univ. London, 1961
- 115.- Osada, M: electron microscopic studies on protozoa. Fine structure of E. histolytica. Keio J. Med. 8:99, 1959

- 116.- Kumate, J.: Enfermedades parasitarias. Ed. Atheneo 1981
- 117.- Fletcher, K.A. et al.: electron microscope studies of trophozoites of *E. histolytica*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 56: -- 496, 1962
- 118.- Rondanelli, E.G. et al.: Comparazioni ultrastrutturali fra diverse specie di *Entamoeba* a cisti tetranucleate. -- *Boll. Ist. Sieroter. Milán* 46:583, 1967
- 119.- Robinson, G.L.: The laboratory diagnosis of human-parasitic amoebae. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62(2):285, 1968
- 120.- Castro, H.F.: Anatomic and pathological findings in amebiasis. Report of 320 cases. In: Padilla y Padilla S.A. -- Illinois, U.S.A. Charles C. Thomas p.44, 1974
- 121.- Bran, J.L.: Epidemiology. Amebiasis in man; Illinois U.S.A. Charles C. Thomas p.37, 1974
- 122.- Brandt, H. et al.: Pathology of human amebiasis. *Human Pathol.* 1:351, 1970
- 123.- Sargeant, P.G. et al.: The epidemiology of *E. histolytica* in México City. *Trans. Roy. Soc. Med. Hyg.* 74(5):653, 1980
- 124.- Mizgireva, M.F.: The variability of the virulent - properties of *E. histolytica* (Russian) *Med. Parazit. (Mosk)* - 35:673, 1966
- 125.- Jarumilinta, R. et al.: Enzymes of *E. histolytica* - *Bull. Wld. Hlth. Organ.* 41:269, 1969
- 126.- Diamond, L.S.: Axenic cultivation of *E. histolytica* *Science* 134, 336, 1961
- 127.- Diamond, L.S.: Techniques of axenic cultivation of *E. histolytica* Schaudin, 1903 and *E. histolytica*-like amoebae - *J. Parasitol.* 54(5):1047, 1968
- 128.- Diamond, L.S.: Improved method for the monoxenic - cultivation of *E. histolytica* Schaudin 1903 and *E. histolytica*-like amoebae with trypanosomatids. *J. Parasit.* 54:715, 1968
- 129.- Dreyer, D.A.: Growth of a strain of *E. histolytica*-

like amebae with trypanosomatids. Texas Repts.Biol.Med. 19:--  
393,1961

130.- Jackson,G.J. et. al.: Axenic cultures studies of--  
Entamoeba species. Am.J.Trop.Med.Hyg. 13:520,1964

131.- Richards,C.S. et.al.;:Cultivation of E. histolytica  
and E. histolytica-like strains at reduced temperature and --  
behaviour of the amoebae in diluted media.Am.J.Trop.Med.Hyg.--  
15:648,1966

132.- Luttermoer,G.W. et.al.: Some effects of cultural a  
societes of the infectivity of a strain of E. histolytica for  
the rabbit. Am.J.Trop.Med.Hyg. 5:731,1952

133.- Phillips,BP. et. al.: Effects of growth in vitro -  
with selected microbial associates and encystation and encys-  
tation on the virulence of E. histolytica for guinea pigs. Am.  
J.Trop.Med.Hyg. 3:621,1954

134.- Vincent,P. et.al.- Duration if invasiveness of E.-  
histolytica mantained in vitro. Parasit. 50:499,1960

135.- Thompsom,P.E. et.al.: Observaton on the virulence-  
of E. histolytica during prolonged subcultivation. Am.J.Trop.  
Med.Hyg. 59:249,1954

136.- Chang,S.L.: Studies on the E. histolytica. J.Infect.  
Dis. 76:126,1945

137.- Hoare,A.C.: The commensal phase of E. histolytica-  
Parasitological Reviews 1:411,1952

138.- Acevedo,O. et.al.: Panorama amibiano. Rev. Med. -  
Hosp.Gen. 23:167,1960

139.- Beltrán,H.F. et.al.- Invasión de la pared intesti-  
nal e hipersensibilidad a Entamoeba histolytica. En prensa --

140.- Neal,R.A.: The influence of encystation upon the -  
virulence of E. histolytica to rats. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.-  
Hyg. 48:533,1954

141.- Maegraith,B.G. et.al.: Experimental amoebic infec-  
tion of the liver in guinea pigs. Ann.Trop.Med.Parasitol. --  
48:434,1954

- 142.- Barrett-Connor, E.: amebiasis, today in the United States. Calif. Med. 114:1, 1971
- 143.- Turner, J.A. et. al.: Amebiasis. A symposium. Calif. Med. 114:44, 1971
- 144.- Rodríguez de Silva, J.: Comunicación personal.
- 145.- Flores-Barroeta, F. et. al.: Observaciones sobre amebiasis en material de autopsia. Estudio de 109 casos. Prens.- Med. Méx. 24:141, 1959
- 146.- Reyes-Mota, A. et. al.: Estudio de las causas de muerte en las autopsias del Hospital Juárez de 1959 a 1962 con especial referencia a los abscesos hepáticos amebianos. Rev. Cir. Hosp. Juárez. 109:19, 1963
- 147.- Salas, M. et. al.: Patología de la amebiasis en los niños. Bol. Med. Hosp. Inf. Méx. 15:185, 1958
- 148.- Biagi, F.F.: Epidemiología de la amebiasis en México. Proc. 7o Internat. Trop. Med. Mararia 2:268:1964
- 149.- Martschuchelli, Q.A. et. al.: Frecuencia de las parasitosis en México. Rev. Hosp. Gen. Méx. 23:579, 1960
- 150.- Knigh, R: Surveys for amoebiasis, interpretation of data and their implications. Ann. Trop. Med. Parasitol. 69. - 35, 1975
- 151.- Balamuth, W. et. al.: Amoebas and other intestinal protozoa. In: Immunity to parasitic animals. Jackson, G.C.; -- Herman R. and Singer I. (Ed) N.Y., Academic Press 2:439, 1970
- 152.- Maegraith, B.G.: Pathogenesis and pathologic mechanisms in protozoal diseases with reference to amoebiasis and malaria. In: Immunity to protozoas. Garnhaw, P.C.C.; Pierce, A.- G. and Roitt, I. (Eds) Philadelphia, F.A. Davis Co. p 48, 1963
- 153.- Biagi, F. et. al.: Amebiasis: un reto a la comprensión de los mecanismos patogénicos. Gac. Med. Mex. 97:71, 1969
- 154.- Biagi, F. et. al.: The challenge of amoebiasis, understanding pathogenic mechanism. Int. Rev. Trop. Med. 3:219, 1969
- 155.- Neal, R.A.: Pathogenesis of amoebiasis. J. Br. Soc. --

Gast-Gut 12:483,1971

156.- Neal, R.A.: Pathogenesis of amoebiasis. In: Clinical Tropical Medicine. Ed. 2 Cahill, K.M. (Ed) Baltimore, University Press. 2:134,1972

157.- Honigberg, B.M.: Mechanisms of pathogenicity among parasitic protozoa. In: Progress in protozoology. University of Clermont, Ver-8 Sciences Exactes et Naturelles, 1973

158.- Bos, H.J.: The problem of pathogenicity in parasitic entamoeba. University of Laiden, 1973. Thesis.

159.- Neal, R.A. et. al.: Starin variation in *E. histolytica*. Parasitol. 45:152,1955

160.- Stamm, W.P.: Amoebic aphorisms. Lancet.

161.- Eyles, D.E. et. al.: A study of *E. histolytica* and other intestinal parasites in a rural west Tennessee community Am.J.Trop.Med.Hyg. 2:173,1953

162.- Lamont, N. et.al.: Hepatic amebiasis. Quaxt.J.Med.- (N.S.) 27:389,1958

163.- Maddison, S.E. et.al.: Bacterial infection of amoebic liver abscess. Med.Proc.Johannesburg.5:514,1959

164.- Faust, E.C.: The multiple facets of *E. histolytica* infection. Int.Rev.Trop.Med. 1:43,1961

165.- Hoare, C.A.: The enigma of host-parasite relations in amebiasis. Rice.Inst.Pam. 45:23,1958

166.- Meleney, H.E.: Some unsolved problems in amebiasis. Amer.J.Trop.Med.Hyg. 6:487,1957

167.- Brooke, M.M.: Amebiasis, methods in laboratory diagnosis. Public Health Service, U.S. Department of Health Education and Welfare, 1960

168.- Report: Symposium on laboratory aspects of amebiasis. Tras.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 51:303,1957

169.- Hoare, C.A.: Amoebic infections in animals. Vet.Rev. Annot. 5:91,1959

170.- Neal, R.A.: Enzymic proteolysis by *Entamoeba histo-*



lytica: biochemical correlations, characteristics and relationships with invasiveness. *Parasit.* 50:531,1960

171.- Nelson, E.C. et. al.: Culture isolation of agents of primary amebic meningoencephalitis. *J. Parasit.* 56(4):531,1970

172.- Beauer, P.C. et. al.: Experimental entamoeba infection in man. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 5:1000,1956

173.- Healy, G.R. et. al.: Studies on the pathogenicity of various strains of *E. histolytica* after prolonged cultivation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15,294,1966

174.- Loran, M.R. et. al.: Dependence of *E. histolytica* upon associated streptobacillus for metabolism of glucose. *Exp. Cell. Res.* 10;241,1956

175.- Phillips, B.P. et. al.: Studies on the ameba-bacteria relationship in amebiasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 4:675,1955

176.- Phillips, B.P.: et. al.: Studies on the ameba-relationships in amebiasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 7:392,1958

177.- Elsdon-Dew, R.: Further aspects of amebiasis in Africans. *Afric. J. Med.* 2:291,1956

178.- Freedman, L.: The epidemiology of amebiasis in Durban. *S. African Med. J.* 32:797,1934

179.- Nakamura, M. et. al.: Occurrence of glutaminase in *E. histolytica*, *Nature* 179:1134,1959

180.- Nakamura, M. et. al.: Casease in *E. histolytica*. *Nature* 183,397,1959

181.- Nakamura, N.: Ribonuclease and desoxyribonuclease in *E. histolytica*. *Exp. All. Research.* 17:555,1959

182.- Sermar, C.R.: Inhibition of the succinic dehydrogenase of parasitic protozoans by an arson and a phosphonoanalog of succinic acid. *Exp. Parasit.* 2:366,1953

183.- Blumenthal, H. et. al.: Some aspects of the phosphomonoesterase activity of *E. histolytica* *Ex. Parasit.* 4:201,1965

184.- Brsdin, J.L. Jr.: Studies on the production of hyaluronidase by *E. histolytica*. *Exp. Parasit.* 6:459,1957

- 185.- Hilker, D.M. et.al.: Starch hydrolysis by *E. histolytica*. *J. Exp. Parasit.* 6:459, 1957
- 186.- Hallman, F.A. et.al.: Esterase activity of *E. histolytica*. *J. Parasit.* 41:325, 1955
- 187.- Nakamura, M. et.al.: Enzymes of *E. histolytica*. --- *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100:403, 1959
- 188.- Manual de ejercicios del departamento de microbiología y parasitología. Facultad de Medicina, U.N.A.M.: Observaciones de producción de gelatinasa por *E. histolytica*. p.119-1966
- 189.- Sodum, E.H. et.al.: Effect of single inoculum of *E. histolytica* trophozoites on guinea pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73, 362, 1950
- 190.- Elson-Dew, R.: Endemic fulminating amebic dysentery *Am. J. Trop. Med.* 29:340, 1949
- 191.- Walker, E.L. et.al.-Experimental Entamoebic dysentery. *Philippine J. Sci.* 8:253, 1913
- 192.- Rawewan, J. et.al.: Intestinal amoebiasis. *Amer. J. Trop. Med. Parasit.* 55:383, 1961
- 193.- Biagi, F.F. et.al.: Influence of some steroids in the experimental production of amebic hepatic abscess. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 12:318, 1963
- 194.- Robbins, S.L.: Patología estructural y funcional -- Ed. Interamericana, 1975
- 195.- Shaffer, J.G. et.al.: The effect of rabbit antiserum on the ability of *E. histolytica* to phagocytose red blood cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 5:53, 1956
- 196.- Goldman, M: Use of fluorescein-tagged antibody to identify cultures of *E. histolytica* and *E. coli*. *Amer. J. Hyg.* 59:318, 1954
- 197.- Goldman, M. et.al.: Antigenic analysis of *E. histolytica* by means of fluorescent antibody. *Exp. Parasit.* 10(366):388, 1960

193.- Kessel, J.F. et. al.: Preliminary report on the -- hemagglutination test for *Entamoeba histolytica*. Proc Soc. Exp.- Biol. Med. 106:409, 1961

199.- Milgran, E.A. et. al.: Studies on the indirect hemagglutination test in diagnosis of amoebiasis. Gastroenterology 50:645, 1966

200.- Marx, A. et. al.: Demonstration of enterobacterial -- common antigen by bacterial agglutination. Inf. Immun. 18(3):- 563, 1977

201.- Kessel, J.F. et. al.: Indirect hemagglutination- and complement fixation tests in amoebiasis. Am. J. Trop. Med. - Hyg. 14(4):540, 1965

202.- Boeck, W.C. et. al.: The cultivation of *E. histolytica*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 5:371, 1925

203.- Butt, C.G.: Primary amebic meningoencephalitis. N.- Eng. J. Med. 281:1315, 1969

205.- Craig, C.F.: Complement fixation in the diagnosis - of infections with *E. histolytica*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 8:29, 1928

206.- Rees, C.W. et. al.: A preliminary notes on the com - plement fixation test for amebiasis. Am. J. Trop. Med. 22:581, 1942

207.- Hall, B. et. al.: Observation on the value of the -- complement fixation test in the diagnosis and management of a moebiasis. M. J. Australia 1:32, 1957

208.- Biagy, F. et. al.: Immobilization reaction for the -- diagnosis of amoebiasis. Exp. Biol. Parasit. 11:188, 1961

209.- Nakamura, M. et. al.: Agar diffusion precipitation technique for the detection of antibodies against *E. histolytica*. Bac. Proc. (M105), p. 95

210.- Craig, C.F.: Amebiasis and complement-fixation test U.S. Armed Forces W. J. 1:1337, 1950

211.- Litter, M.: Tratado de Farmacología. Ed. Atheneo, S.A.

212.- Ouchterlony, O.: Antigen-antibody reactions in gels Act. Pathol. Microbiol. Scand. 32:2311, 1953

- 213.- Garvey, J.S. et.al.: Ammonium sulfate precipitation Methods in Immunology 3th ed.p.218,1980
- 214.- Kagan, I.G. et.al.: Serological tests: In: Manual - of clinical microbiology. 2th ed. American Society of Micro - biology. Washington, D.C.p.650,1974
- 215.- Aurameas, S.: Coupling of enzymes to protein with - glutaraldehyde. Imunochemistry 6:43,1969
- 216.- Aurameas, S: Immunoenzyme techniques. Int.Rev.Cytol. 27,349,1970
- 217.- Bretton, R. et.al.: Comparison with peroxidase and - ferriting labeling of cellular surface antigens. Exp.Cell.Res. 71:145,1972
- 218.- Hoffman, N.A. et.al.- Application of peroxidase la - beled antibodies to the localization of antigen.J.Histochem.- Cytochem. 19:811,1971
- 219.- Mazurkiewicz, J.E.: Ligth and electron microscopic - localization of antigens in tissues embedded in poliethylene - glycol with a peroxidase labelled antibody method. J.Hist. -- Cyto. 20:969,1972
- 220.- Nakane, P.K. et.al.: Enzyme-labelled antibodyes for the light and electron microscopic localization of tissue an - tigenes. J.Cell.Biol. 33:307,1967
- 221.- Shabo, A.L. et.al.: Immunoperoxidase localization - of herpes zoster virus and simian virus 40 of immunochemistry Appl.Microbiol. 123:1001,1972
- 222.- Sternberger, L.A. et.al.: The unlabeled antibody -- enzyme method of immunochemistry. Histochem.Cytochem 18:315,- 1970
- 223.- Weir, E.E. et.al.: Destruction of endogenous peroxi - dase-labelled antibodyes . J.Histochem.Cytochem. 22,51,1974
- 224.- Lück, H.: Peroxidase, Methods of enzymatic analysis Ed. by: H.U. Beremeyer. Acadec Press, N.Y. p.895,1963
- 225.- Graham, R.C.Jr. et.al.: The early stages of absorp - tion of injected horseradish peroxidase in the proximal tubu -

les of mouse kidney. *J. Cytochem. Histochem.* 4:291, 1966

226.- Seligman, A.M. et al.: Some cytochemical correlations between oxidase activity and chemical structure. *Histochemie* 22:85, 1970

227.- Weinryb, I.: Horseradish peroxidase. Dissertation.- Yale University, 1967

228.- Naccache, C.: et al.: An electron surface of  $\text{MoO}_3$ -- $\text{Al}_2\text{O}_3$  and  $\text{MoO}_3$ - $\text{SiO}_2$  catalysts. *J. Catal.* 25:334, 1972

229.- Takemoto, K. et al.: The temperature dependence of absorption spectra of cation radicals of benzidine and N,N,N',N' tetramethylbenzidine and their demerization in solution. *Bull. Chem. C. (Jap)* 41:764, 1968

230.- Coons, A.H.: Fluorescent antibody methods. Ed. J.F. Danielli. Academic Press, N.Y. p.399, 1958

231.- Schick, A.F. et al.: On the formation of covalent linkages between two protein molecules. *J. Biol. Chem.* 236:2477 1961

232.- Theorell, H.: The iron-containing enzymes. *J. Biol. Chem.* 236, 2477, 1961

233.- Sanger, F.: The free amino groups of insulin. *Biochem. J.* 39:507, 1945

234.- Campbell: Métodos inmunológicos. Ed. Addison-Wesley Publishing Co. Inc. p.193, 1977

235.- Lowry, O.H.: Protein measurement with Pholin-phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951

236.- Biomoléculas: Lecciones de bioquímica estructural- Macarulla, Goñi. Ed. Reverté. p.162, 1981

*Artéknika*

AV INST. POL. NAL. 1855-X  
COL. LINDAVISTA TEL. 546-71-98

