

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

RECONOCIMIENTO DE ANTIGENO DE MEMBRANA
DE ENTAMOeba HISTOLYTICA POR SUEROS DE
PACIENTES CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ROJAS MINGUER AUSTREBERTHA

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pags:
APENDICE	1
I.- INTRODUCCION	3
II.- GENERALIDADES	5
II.1.- Morfología	5
II.2.- Historia	6
II.3.- Tipos de inmunidad	10
II.3.1.- Inmunidad humoral	10
II.3.2.- Inmunidad celular	11
II.4.- Antigenos de superficie	11
II.5.- Patogenia	14
II.6.- Sintomatología	17
II.7.- Diagnóstico	18
III.- OBJETIVOS:	19
III.1.- Objetivo general	19
III.2.- Objetivos específicos	19
IV.- MATERIALES Y METODOS	21
IV.- Materiales	21
IV.1.- Cultivo axénico de trofozoitos	24
IV.1.1.- Preparación del medio de cultivo	24

IV.1.2.- Siembra y cosecha de los trofozoitos	25
IV.2.- Solubilización de proteínas	26
IV.2.1.- Soluciones	26
IV.2.2.- Extracción de membranas	26
IV.3.- Determinación de proteínas por el método de Lowry	27
IV.3.1.- Soluciones	27
IV.3.2.- Curva de referencia	27
IV.4.- Determinación de azúcares por el método fenol-sulfúrico	28
IV.4.1.- Soluciones	28
IV.4.2.- Curva de referencia	29
IV.4.3.- Muestra problema	29
IV.5.- Obtención de líquido de ascitis	30
IV.5.1.- Soluciones	30
IV.5.2.- Material biológico	30
IV.5.3.- Procedimiento	30
IV.6.- Obtención de antisuero de conejo	31
IV.6.1.- Antígeno	31
IV.6.2.- Inmunización	31
IV.6.3.- Suero	31
IV.7.- Doble inmunodifusión	32
IV.7.1.- Soluciones	32
IV.7.2.- Preparación de la placa	32
IV.8.- Técnica de ELISA	33
IV.8.1.- Soluciones	33
IV.8.2.- Preparación de la placa de ELISA	35

IV.9.- Inmunolectrotransferencia	37
IV.9.1.- Soluciones	37
IV.9.2.- Preparación de las placas	42
IV.9.3.- Preparación de las muestras	43
IV.9.4.- Electroforesis	43
IV.9.5.- Tinción protéica con azul de Coomassie y preservación del gel	44
IV.9.6.- Tinción protéica con plata	44
IV.9.7.- Transferencia	45
V.- RESULTADOS	48
VI.- DISCUSION	57
VII.- CONCLUSIONES	63
VII.- BIBLIOGRAFIA	65

A P E N D I C E

AHA	absceso hepático amibiano
cm	centímetros
cc	centímetros cúbicos
DEM	Medio Dulbecco
D.O.	densidad óptica
ELISA	ensayo inmunológico específico con enzima ligada a anticuerpo.
<u>E. histolytica</u>	<u>Entamoeba histolytica</u>
GM	glucoproteínas de membrana de <u>Entamoeba histolytica</u>
g	gramos
°C	grados centígrados
Ig	Inmunoglobulinas
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IET	Inmunoelectrotransferencia
kd	kilo daltons
l	litros
LPFG	Lipopeptidofosfoglicana
M	Molar
mA	mili Amper
ml	mililitros
mM	mili Molar
mm	milímetros
N	Normalidad

nm	nanómetros
OPD	orto-fenilendiamina
PBS	amortiguador de fosfatos salino
PAGE	geles de poliacrilamida
pH	logaritmo negativo de la concentración de iones hidrogeno.
PNC	papeles de nitrocelulosa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
S.S.F	solución salina fisiológica
ug	microgramos
ul	microlitros

I.- INTRODUCCION

La amibiasis es una infección producida en el ser humano por Entamoeba histolytica (7) y se puede definir como la condición de hospedar al protozoario con o sin manifestaciones clínicas (10).

Esta especie generalmente se localiza en el humano en el intestino grueso sin embargo, bajo ciertas condiciones puede invadir la mucosa intestinal y provocar disentería amibiana, o aún más, causar amibiasis invasiva en el hígado, aunque también puede afectar otros órganos (38).

La amibiasis es una de las enfermedades más importantes que se presentan en todo el mundo, siendo más frecuente en los países tropicales.

La problemática abarca a los dos grupos poblacionales: el rural, donde existe una gran carencia de servicios, tales como: agua potable, drenaje, etc., y el urbano donde existen estos servicios aunque desequilibrados.

La amibiasis afecta generalmente a niños menores de 5 años aunque también es frecuente en adultos del sexo masculino.

La investigación sobre la amibiasis se orientó inicialmente hacia su diagnóstico y tratamiento; paulatinamente su estudio se extendió hasta abarcar la morfología y fisiología amibiana, así como las reacciones inmunológicas del huésped,

la epidemiología y la experimentación en animales, a fin de obtener un mejor conocimiento del parásito y conseguir medidas inmunoproliféricas eficaces para combatirlo, como por ejemplo una vacuna.

Sin duda, la mayor repercusión de esta enfermedad es a nivel gastrointestinal, donde un individuo puede llegar a presentar varios cuadros clínicos durante el curso de su vida, pero la principal complicación de la amibiasis se presenta cuando la E. histolytica rebasa la membrana intestinal y por corriente sanguínea, se localiza en otros órganos por ejemplo en el hígado, donde ocasiona la formación del absceso hepático amibiano (AHA), que puede originar la muerte del individuo.

II.- GENERALIDADES:

II.1.- Morfología:

Las amibas se presentan en forma de quistes (forma inmóvil resistente), y en forma de trofozoitos (forma móvil) que invade los tejidos del huésped (37).

Entamoeba histolytica (Schaudinn, 1903) es un protozooario anaeróbico perteneciente al Subphylum Sarcomastigophora, Superclase Sarcodina, Clase Rhizopoda Orden Amoebida y familia Endamoebidae (3).

Su ciclo vital completo consiste de cuatro estadios consecutivos: trofozoito, prequiste, quiste y metaquiste (30).

El trofozoito se reproduce por fisión binaria, produciendo bajo ciertas condiciones apropiadas un quiste mononucleado que, tras dos divisiones nucleares sucesivas, forma un metaquiste que por división origina ocho trofozoitos uninucleados (30). La transmisión a un nuevo huésped se realiza por la ingestión de quistes en alimentos o agua contaminados.

El quiste presenta forma esférica u oval, con un diámetro de 8 a 20 micras y una pared de 125 a 150 nm de grosor. Su membrana plasmática frecuentemente presenta profundas invaginaciones y en su citoplasma se observan polirribosomas, vacuolas y depósitos de glucógeno. En el

núcleo existe un cariósoma que puede ser central, cuerpos cromatóidales y cromatina periférica adherida a la envoltura nuclear (38).

El trofozoito es una fase altamente dinámica y pleomórfica, su tamaño en cultivo in vitro varía de 15 a 30 micras dependiendo de las condiciones del medio (38).

La membrana plasmática es similar a la de otras células eucariontes, con una cubierta celular apenas detectable (46).

El citoplasma contiene diferentes organelos: cuerpo denso, ribosomas y polisomas, gránulos osmiófilos, cuerpos helicoidales y cuerpos tubulares (37), numerosas vacuolas alimenticias grandes, mayores a 2 micras y vesículas pequeñas, menores a 2 micras cuyas membranas poseen la misma estructura que la membrana plasmática (37, 3); presenta también lisosomas activos de superficie especializados (37, 18).

La ameba carece de mitocondrias y aparato de Golgi, y su retículo endoplásmico consiste de vesículas finas rodeadas de algunos ribosomas (37, 35). El núcleo es ovalado con un nucleolo central y cromatina periférica, y contiene estructuras densas de probable naturaleza viral. La envoltura nuclear presenta gran cantidad de poros (37).

II.2.- Historia:

La existencia de la amebiasis se puede situar desde la

aparición del hombre en la Tierra. Sin embargo no es sino hasta el siglo XIX cuando empieza a estudiarse al parásito causante de esta enfermedad.

Fedor Lösh, médico ruso, publicó la primera descripción de un caso de disentería amibiana recurrente en 1875. Este estudio abarcó el análisis del contenido de la materia fecal del paciente y el material de la autopsia, así como la descripción de la amiba incluyendo su estructura, tamaño, movilidad, núcleos, vacuolas y elementos intracitoplasmáticos tales como células rojas. Además, llevó a cabo experimentos en los que administró la materia fecal del paciente a cuatro perros (8).

Lösh llamó a la amiba Amoeba coli, y concluyó que la disentería no era debido a este organismo, pues el curso de la enfermedad fue diferente para su paciente y los animales de experimentación.

En 1883, Koch observó la presencia de amibas en cortes histológicos provenientes de pacientes con disentería y complicaciones de absceso hepático, y pensó que esto pudiese tener algún papel en la patogenia de la enfermedad.

En 1893, Quinck y Ross demostraron los quistes de la amiba y observaron que estas formas vegetativas eran capaces de producir disentería en animales de experimentación. y notaron la gran resistencia de los quistes comparada con la fragilidad de los trofozoítos.

Councilman y Lafleur, reconocieron la amibiasis como entidad clínica, causada por un agente específico que llamaron Amoeba dysenteriae e introdujeron los términos de "disenteria amibiana" y de "absceso hepático amibiano".

En 1903 Huber detalló el número de núcleos de los quistes de la amiba. Ese mismo año Schaudinn, brillante protozoólogo asigna los términos de Entamoeba histolytica, para especie patógena, debido a su capacidad de destruir los tejidos; y Entamoeba coli para la especie no patógena, la cual es un comensal inocuo del intestino grueso.

A lo largo de todos estos años fueron desarrollados numerosos medios de cultivo para el crecimiento in vitro de E. histolytica entre los que se pueden mencionar el de Musgrave y Clegg (1904), el de Boeck y Drbohlav, llamado "loecke's egg-serum" (1925), El de Snafer y colaboradores (1948), el de Pan (1960) y finalmente Diamond en 1961 que elaboró un cultivo libre de otros asociados, el cual ha facilitado las investigaciones bioquímicas e inmunológicas de este protozoario (21, 24, 39).

El cultivo in vitro de E. histolytica asociada a bacterias se logró en 1925, a partir de entonces se probaron distintos medios (que culminaron en 1968) con el cultivo axénico, (medio libre de organismos asociados), creado por Diamond (13).

En 1969 Lunde y Diamond al emplear antígeno total preparado mediante homogenización de trofozoítos cultivados axénicamente, establecieron patrones inmunoelectroforéticos

de diferentes cepas amebianas y obtuvieron evidencias de que E. histolytica es inmunológicamente diferente a otras amibas de morfología similar (29).

Las diferentes cepas de E. histolytica varían en su grado de virulencia, la cual disminuye a medida que aumenta el tiempo de cultivo en medio axénico y se incrementa por pasajes sucesivos a través de un animal huésped y/o reasociación con flora bacteriana (10, 42, 56).

Sargeant y col., diferenciaron las cepas patógenas de las no patógenas en base a un patrón electroforético de cuatro isoenzimas aisladas de pacientes con manifestaciones clínicas y cepas de pacientes asintomáticos, y debido a su especificidad permite diferenciar fácilmente E. histolytica de otras Entamoebas en otros géneros de amibas, limitando así el tratamiento amebicida exclusivamente a los pacientes que hospedan amibas patógenas (50, 51).

Según estudios realizados, tanto con sueros obtenidos de individuos sanos, como de sueros de pacientes con amebiasis (con títulos altos de anticuerpos anti-E. histolytica) se observó en los sueros de los pacientes una actividad amebicida hacia los trofozoitos a través de la activación del complemento (42, 52).

Khan y Meerovitch en 1968 empleando trofozoitos de E. histolytica sonicados y liofilizados, obtuvieron bandas de precipitación tanto de sueros de pacientes, como con suero de conejo que contienen anticuerpos frente a E. histolytica.

observando reacciones de identidad con antígenos de otras especies amibianas (25, 26).

Krupp en 1977 mediante el empleo de pruebas inmunológicas con sueros de pacientes de diferentes regiones geográficas, identificó catorce antígenos en trofozoitos de E. histolytica cultivados axénicamente (30).

Poco después, en 1978 Parkhouse y cols. demostraron que los principales antígenos de membranas de E. histolytica que son reconocidos por sueros de pacientes son de naturaleza glucoproteica (43).

II.3.- Tipos de inmunidad:

Solo cuando el parásito invade los tejidos se desencadena la respuesta inmune, que es de tipo humoral y celular. Kretschmer, un experto en la materia, ha hecho varias contribuciones en esta área y publicó un extenso análisis del tema (29).

II.3.1.- Inmunidad humoral:

Esta es la forma de respuesta inmune más conocida, se caracteriza por la producción de anticuerpos específicos en el suero del receptor estimulado antigénicamente (43).

La respuesta humoral en la amibiasis intestinal se caracteriza por la aparición de anticuerpos predominantemente de la clase IgG, una semana después de la aparición de los

primeros síntomas en aproximadamente el 70% de los casos (23).

El estudio de las inmunoglobulinas en el suero de los pacientes con amibiasis, en tres regiones endémicas, mostró que la IgG se encontraba elevada mientras que la IgA y la IgM se encontraban dentro de los límites normales (1, 44).

II.3.2.- Inmunidad celular:

Esta inmunidad no se manifiesta por la aparición de anticuerpos, de hecho no se ha logrado demostrar en forma definitiva la presencia de sustancias que los caractericen a este tipo de inmunidad. Existen evidencias de que hay inmunidad celular contra la amibiasis en sujetos que han padecido la enfermedad.

La importancia de la inmunidad celular, también ha sido evaluada mediante la reacción de hipersensibilidad tardía. Para esto se han empleado como antígenos, extractos de amiba y fracciones parcialmente purificadas.

Algunos investigadores han encontrado que la respuesta de hipersensibilidad tardía específica es negativa en la fase inicial del AHA y se recupera en días subsecuentes a la curación (27, 28 y 32).

II.4.- Antígenos de superficie:

Los antígenos de superficie de trofozoitos de E. histolytica son los primeros en ser reconocidos por el sistema inmune.

La existencia e importancia de estos antígenos ha sido demostrada por la inmovilización de los trofozoitos por suero inmune (5, 6, 11), unión del suero inmune fluoresceinado a trofozoitos intactos (52, 9, 12), y la lisis de trofozoitos mediada por anticuerpos y complemento (42, 52).

Los antígenos más empleados hasta la fecha han sido, células completas y sus homogenizados, así como fracciones solubles o particuladas obtenidas a partir de trofozoitos (48).

La mayoría de los estudios efectuados están relacionados con antígenos capaces de producir respuesta inmune celular.

A partir de la última década se iniciaron los estudios acerca de la naturaleza de estos antígenos, habiéndose aislado varias proteínas de las fracciones de membrana de E. histolytica (43, 41, 53).

En 1980 Aley y col. empleando trofozoitos de E. histolytica cultivados axénicamente desarrollaron una metodología para el aislamiento de membrana plasmática, basado en su unión específica con concavalanina A, que estabiliza la membrana, evita su fragmentación y facilita su separación (4).

Se obtuvieron estructuras del parásito y de las fracciones celulares aisladas, se determinaron sus propiedades químicas y enzimáticas identificándose cuando menos 12 componentes glucoproteicos de membrana plasmática.

En estudios previos se reportó el porcentaje promedio de proteínas de cada fracción amibiana, separada por el método

de Aley así como el porcentaje en peso seco (tabla 1) y el contenido de azúcar (tabla 2) en las mismas fracciones (47).

TABLA 1:

Porcentaje de las fracciones celulares de E. histolytica obtenida por el método de Aley (47). Porcentaje de proteínas y peso seco de 150×10^6 amibas:

	Proteínas %	Peso seco %
Componentes solubles	61.0	62.0
Membranas internas	14.7	28.0
Membranas no vesiculadas	16.8	7.2
Membranas plasmáticas	2.6	2.4

TABLA 2:

Contenido de azúcares y proteínas de E. histolytica:

60×10^6 Amibas	Azúcares mg	Proteínas mg
Componentes solubles	2.51	41.72
Membranas internas	2.58	9.3
Membranas no vesiculadas	3.33	12.6
Membranas plasmáticas	0.24	2.2

En la actualidad la identificación y purificación de los antígenos de superficie se ha facilitado por el empleo de anticuerpos monoclonales.

En 1975, Kohler y Milstein demostraron que clones individuales de células que secretaban anticuerpo, podían ser cultivadas por fusión de células con mieloma. Este hallazgo inició el estudio de los anticuerpos monoclonales que actualmente se utilizan en la obtención de anticuerpos homogéneos contra una gran variedad de antígenos que se han usado como reactivos en muchas de las técnicas para la identificación de especies, serotipos y variaciones antigénicas en diversos microorganismos (34).

Agundis y col. (2) obtuvieron anticuerpos monoclonales contra glucoproteínas de membrana de E. histolytica. Encontraron 7 hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra una glucoproteína y de estos, 3 reconocen también la lipopeptidofosfoglicana (LPFG), aislada a partir de trofozoítos de E. histolytica cepa HK-9 NIH. Se caracterizó y probó que era reconocida por sueros de pacientes con absceso hepático amibiano (31). La LPFG se encuentra en la superficie de los trofozoítos de E. histolytica.

II.5.- Patogenia:

Se sabe que la forma infectante de E. histolytica es el quiste, que puede permanecer viable por varios días en las heces y sobrevivir en el suelo hasta 8 días, con

temperaturas entre 28 y 34°C y hasta un mes a 10°C., también permanece infectante en el agua y en la materia orgánica en general. La fuente de infección son los portadores que eliminan los quistes en forma cíclica, por periodos variables pero que en términos generales son de varios meses.

Existen variaciones en cualquier infección por lo que respecta a la capacidad del inoculo y la resistencia del inoculado. Se han efectuado muchos experimentos sobre las variaciones en la patogenicidad de las cepas. Algunos autores creen que ciertas bacterias, favorecen la patogenicidad de la E. histolytica. A este respecto, el experimento más notable fué el de Westphal (1937), el cual ingirió cápsulas que contenían quistes lavados de E. histolytica al cabo de dos días aparecieron en las heces quistes y trofozoítos, sin que se presentaran síntomas de la enfermedad. Entonces Westphal ingirió 50 cc de una suspensión de heces con amibas libres procedentes de un enfermo que presentaba disentería amibiana, y al cabo de 28 días tenía la disentería amibiana típica (8).

La frecuencia de la infección amibiana medida por la presencia de quistes de E. histolytica en heces fecales y en base a las numerosas encuestas publicadas, arroja la cifra aproximada de 500 millones de individuos infectados en todo el mundo, con predominio en Asia, Africa, Centro y Sudamerica (54).

En México, la información publicada señala que la infección

amibiana se encuentra extendida en todo el país, en forma independiente del clima, y que predomina en medios mal saneados y de bajo nivel socioeconómico. La más amplia encuesta sobre invasión amibiana fué practicada en 1974 (22) y reveló que el 5.95% de los 19,442 sujetos estudiados tenía anticuerpos contra E. histolytica, con mayor frecuencia entre los 5 y 10 años de edad, excepto en áreas de endemicidad elevada con frecuencias altas también en el primer quinquenio de vida.

El efecto patógeno parece ser ejercido por los trofozoitos, formados en el intestino a partir de los quistes que a su vez son la forma infectante del parásito; para producir sus efectos patógenos la amiba debe localizarse en los tejidos (8).

La patogenicidad de la amibiasis se divide de la siguiente manera:

1).- Amibiasis intestinal: Este tipo de amibiasis se divide en: Colitis amibiana aguda, colitis amibiana crónica y amibiasis asintomática.

2).- Amibiasis extraintestinal: Se divide en amibiasis pulmonar, amibiasis cerebral, amibiasis cutánea y amibiasis hepática.

- Amibiasis hepática: El hígado constituye el lugar más frecuente de la amibiasis extraintestinal. La puerta de entrada más probable es la vena porta. Macroscópicamente los abscesos pequeños aparecen como zonas múltiples, sólidas, blancas. A medida que aumentan de tamaño se licúan y la

cavidad se llena con la típica "pasta de anchoas" o "salsa de chocolate". Los abscesos se localizan más frecuentemente en el lóbulo derecho del hígado, cerca de la cúpula. Microscópicamente poseen un centro de material necrótico irreconocible, rodeado por una zona de tejido hepático con necrosis parcial donde sobrevive la degeneración activa. En esta zona se encuentran las amibas. El grado de infiltración inflamatoria depende del grado de contaminación bacteriana. Los abscesos pueden ser únicos o múltiples y en las paredes de éste se pueden localizar a las amibas en forma de trofozoitos. La amibiasis hepática se presenta predominantemente en el sexo masculino.

II.6.- Sintomatología:

En la amibiasis de tipo intestinal un extremo lo constituyen los portadores totalmente asintomáticos y el otro extremo las personas con diarrea sanguinolenta fulminante de aparición rápida con acusada deshidratación en un paciente grave. En muchos ataques fulminantes agudos debidos a la infestación masiva de quistes, se presentan manifestaciones generales como fiebre, escalofríos y leucocitosis. Otras sintomatologías vagas e inespecíficas son: diarrea, dolor poco intenso en el abdomen inferior, apetito variable, ligeras neuralgias, somnolencia, fatiga y depresión (8).

En la amibiasis de tipo extraintestinal los síntomas dependen del lugar en donde se encuentra la lesión. Por ejemplo en la

amibiasis cutánea se producen úlceras que presentan una base gris sucia, de contornos irregulares y bordes colgantes. En la amibiasis de tipo pulmonar y cerebral los síntomas son: escalofríos, fiebre, dolores intensos y neuralgia. En la amibiasis hepática los síntomas son variables: Dolor intenso súbito, temperaturas irregulares remitentes, escalofríos, sudores, a menudo se observa enrojecimiento de la cara y taquicardia.

II.7.- Diagnóstico:

Los métodos de diagnóstico para identificar a las amibas son:

- a).- Amiba en fresco
- b).- Examen coproparasitoscópico de las muestras fecales
- c).- Cultivo de amibas in vitro
- d).- Diagnóstico serológico
- e).- Sigmoidoscopia
- f).- Inoculación en animales de laboratorio de materia fecal procedente del enfermo
- g).- Técnicas radiológicas

III.- OBJETIVOS:

III.1.- Objetivo general:

Reconocer o identificar, por medio de sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano, una glucoproteína de membrana de Entamoeba histolytica (aproximadamente 30-35 Kd).

III.2.- Objetivos específicos:

III.2.1.- Determinación por el método de ELISA de los títulos de anticuerpos frente a E. histolytica en:

a).- Sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano.

b).- Sueros de conejos anti-GM

c).- Líquido de ascitis de ratón (monoclonales).

III.2.2.-Búsqueda por el método de ELISA, de las subclases de inmunoglobulinas presentes en el suero de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano e identificar cual de estas inmunoglobulinas retiene mejor la actividad antigénica en dichos sueros.

III.2.3.- Reconocer por el método de doble inmunodifusión la presencia de antígenos de naturaleza glucoproteica de las membranas de E. histolytica en sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano y sueros de conejo anti-GM y anti-LPPG.

III.2.4.- Reconocer por el método de inmunoelectrotransferencia la presencia de antígenos de naturaleza glucoproteica de las membranas de E. histolytica en sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano y la frecuencia de los mismos.

III.2.5.- Reconocer por el método de inmunoelectrotransferencia la presencia de antígenos de naturaleza glucoproteica de las membranas de Entamoeba histolytica en sueros de conejo anti-GM y anti-LPPG.

III.2.6.- Reconocimiento por el método de inmunoelectrotransferencia de anticuerpos monoclonales (líquido de ascitis de ratón), en antígenos glucoprotéicos de membrana de Entamoeba histolytica, y comparación con el reconocimiento de sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano y sueros de conejo hiperinmunes.

IV.- MATERIALES Y METODOS:

IV.- MATERIALES:

- Ultracentrifuga de 1000 a 20,000 rpm
- Centrifuga de 500 a 10,000 rpm
- Balanza analítica de 0.00 a 100 g
- Balanza analítica de 1 a 10,000 g
- Agitador magnético con imán
- Agitador magnético de rotación
- Agitador eléctrico con regulador de temperatura
- Incubadora con regulador de temperatura
- Campana de flujo laminar
- Cuarto estéril con luz ultravioleta
- Cuarto frío a -4°C
- Congelador -40°C
- Microscopio eléctrico con objetivos 10x y 40x
- Espectrofotómetro de 100 a 1000 nm con celdillas de vidrio
- Lector de ELISA 490 nm
- Autoclave
- Calentador eléctrico con regulador de temperatura
- Baño María eléctrico con regulador de temperatura
- Peachímetro
- Equipo para doble inmunodifusión (cámara húmeda, horadadores, placas de vidrio, papel filtro)
- Equipo para inmunoelectrotransferencia (cubas para la cámara de electroforesis y transferencia, fuente de poder de corriente constante, placas de vidrio de 10 x 82 mm, esponjas, papel filtro, papeles de nitrocelulosa, separadores

o peines de un grosor de 0.75 mm, base para las placas de vidrio, pinzas, soporte para electrotransferencia, sistema de agua refrigerante, electrodos)

- Homogeneizador de cristal Dounce de vástago delgado
- Probetas graduadas de vidrio de 25, 50, 100, 500, 1000 y 2000 ml
- Botellas estériles de 50, 250, 1000 ml de poliestireno.
- Mecheros
- Jeringas de 1, 3, 5, 10 y 20 ml estériles
- Jeringa Hamilton de 1 a 10 ul, 10 a 100 ul y 100 a 1000 ul
- Tubos de vidrio de 5, 10, 15 y 20 ml de vidrio
- Tubos de plástico estériles de 15, 25 y 50 ml
- Tubos de vidrio con tapón de rosca de 20 ml estériles
- Tubos para ultracentrifuga
- Pipetas automáticas de 1 a 100 ul
- Pipetas automáticas de 10 a 500 ul
- Pipetas automáticas de 100 a 1000 ul
- Pipetas serológicas de 0.1, 1, 5, 10 y 20 ml
- Pipetas serológicas estériles de 0.1, 1, 5, 10 y 20 ml
- Pipetas Pasteur
- Puntas de plástico para pipetas automáticas
- Matraces Erlenmayer de 10, 25, 50, 100, 500, 1000 y 2000 ml
- Matraces Erlenmayer de rosca estériles de 150 ml
- Matraces aforados de 50, 100, 500, 1000 y 2000 ml
- Placas para ELISA de poliestireno fondo plano doble fondo, con 96 pozos
- Placas de cultivo de poliestireno de 96 pozos fondo cóncavo estériles

- Placas de cultivo de poliestireno fondo plano de 96 pozos estériles
- Cajas petri de plástico estériles
- Vasos de precipitado de 10, 25, 250, 500, 1000 y 2000 ml
- Embudos de vidrio pata larga y pata corta
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Placas de vidrio de 25 x 75 mm
- Papel filtro Whatman # 1 ederal #4
- Capilares sin anticoagulante
- Viales estériles de 2 ml de poliestireno
- Viales de poliestireno sin esterilizar de 2 ml
- Algodón
- Papel filtro grueso
- Esponja
- Gradillas
- Gasas estériles
- Guantes estériles
- Cubrebocas estériles
- Tijeras
- Bisturí

IV.1.- CULTIVO AXENICO DE TROFOZOITOS:

Se realizó el cultivo axénico de trofozoitos de E. histolytica cepa HM1: IMSS en medio TYJ-S-33 de acuerdo a la metodología descrita por Diamond (15,16):

IV.1.1.- Preparación del medio de cultivo:

-Los constituyentes del medio TYI-S-33 son:

Tripticasa 20 g
Extracto de levadura 10g
Cloruro de sodio 10 g
Glucosa 2g
Fosfato de potasio monobásico 0.6 g
Fosfato de potasio dibásico 1 g
Ac. L. ascórbico 0.2 g
Cisteína monohidratada 1 g
Cittrato amónico férrico 0.0228 g
Agua destilada 870 ml
Hidróxido de sodio 1 N

Disolver cada uno de los reactivos con el agua destilada, ajustar el pH a 6.8 con el hidróxido de sodio 1 N. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

-Mezcla vitamínica comercial (Bio-rad): 30 ml.

-Suero bovino comercial (Bio-rad): 150 ml

Preparación del medio de cultivo:

-Se inactiva el suero bovino por calentamiento a 56 °C

durante 30 minutos. En condiciones de extrema esterilidad y usando una campana de flujo laminar agregar al medio 150 ml de suero bovino inactivo y 30 ml de mezcla vitamínica mezclar y verter aproximadamente 75 ml del medio en matraces Erlenmayer de 125 ml con tapón de rosca (previamente esterilizados).

IV.1.2.- Siembra y cosecha de los trofozoítos:

-los tubos de cultivo de amibas que se encuentren en la fase logarítmica de su desarrollo sumergirlos durante 5 minutos en un baño de hielo, con lo cual se favorece el desprendimiento de los trofozoítos de las paredes.

-Centrifugar a 2,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante, procurando que quede únicamente 0.5 ml en el que se resuspende el paquete celular. Depositar esta solución en el matraz con el medio de cultivo.

-Mezclar suavemente. Incubar a 37 °C hasta la fase logarítmica de crecimiento de los trofozoítos, la cual se alcanza entre 72 y 96 horas de incubación.

-Sumergir los matraces de cultivo en un baño de hielo por 5 minutos. Concentrar las amibas mediante centrifugación a 2,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

-Desechar el sobrenadante y resuspender el paquete amibiano en solución salina fisiológica (0.15 M), en FBS pH 7.2 para su lavado posterior, quedando finalmente en tris, cloruro de magnesio y una mezcla de inhibidores de proteasas.

IV.2.- SOLUBILIZACION DE PROTEINAS (Ref: 14, 33):

IV.2.1.- Soluciones:

-Amortiguador de rompimiento:

Tris 50 mM

Cloruro de potasio 50 mM

Acetato de magnesio 5 mM

P-hidroxi-mercuribenzoato 10 mM

Acido clorhidrico 1 N

Tritón X-100

Agua destilada 1 l

-Disolver cada uno de los reactivos y ajustar a pH 7.6 con acido clorhidrico y aforar a 1 l. Tomar 100 ml de esta solución y agregar 200 ul de tritón X-100.

IV.2.2.- Extracción de membranas:

Resuspender el paquete de amibas en 2 a 3 ml de amortiguador de rompimiento. Homogeneizar y dejar en reposo toda la noche a -4°C .

-Centrifugar a 12,000 rpm durante 20 minutos a 4°C resuspender el precipitado en un volumen igual de amortiguador de rompimiento y repetir el proceso dos veces a fin de extraer la mayor parte de las proteínas solubles. Almacenar las muestras a -20°C .

IV.3.- DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY

(Ref. 36):

IV.3.1.- Soluciones:

a) Reactivo A proteína de referencia 1 mg/ml.

-En este caso se utilizó como proteína estandar 10 mg de albúmina sérica bovina disuelta en 10 ml de solución S.S.F. al 0.85% .

b) El Reactivo B está formado por tres soluciones que se deben mezclar hasta el momento de utilizarse, ya que dicho reactivo es funcional por poco tiempo.

-Tartrato doble de sodio y potasio: disolver 200 mg de tartrato de sodio y potasio en 10 ml de agua destilada.

-Sulfato de cobre: disolver 100 mg de sulfato de cobre pentahidratado en 100 ml de agua destilada.

-Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 1 N.:

Mezclar 1 ml de tartrato de sodio y potasio con 1 ml de sulfato de cobre y añadir 100 ml de carbonato de sodio.

-Reactivo de Folin: mezclar 1 ml del reactivo comercial con 2 ml de agua destilada. Prepararlo al momento de usarse.

IV.3.2.- Curva de referencia:

-Preparar los tubos de ensayo por duplicado de la siguiente manera:

No. del tubo:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Prot. ug	0	0	10	20	30	50	100	150	200	250
St. ml.	0	0	.01	.02	.03	.05	.100	.150	.200	.250
S.S.F. ml	.400	.400	.390	.380	.370	.350	.300	.250	.200	.150

Añadir 2 ml del reactivo B. Dejar reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Agregar a cada tubo 0.2 ml del reactivo de Folin. Mezclar y dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente, en la obscuridad. Medir espectrofotométricamente la absorbancia a 500 nm y graficar ug de proteína contra densidad óptica (D.O). Determinar sobre la curva de calibración los ug de proteína presente, en función de su absorbancia. Calcular los ug de proteína/ml considerando el volumen empleado en cada caso de la muestra problema.

IV.4.- DETERMINACION DE AZUCARES POR EL METODO FENOL-SULFURICO (Ref. 17):

IV.4.1.- Soluciones:

Azúcar de referencia 1 mg/ml

Solución acuosa de fenol al 5%

Acido sulfúrico concentrado

Agua destilada

IV.4.2.- Curva de referencia:

El estándar diluido 1: 10 se utilizó de la sig. manera:

ug st.	ul st.	Fenol ul	Ac. sulfurico ml
50	150	200	1
100	100	200	1
150	50	200	1
200	0	200	1

El estándar sin diluir se utilizó de la sig. manera:

25	175	200	1
----	-----	-----	---

El blanco fué el siguiente:

0	200	200	1
---	-----	-----	---

El ácido sulfúrico se agrega lentamente. Se calientan todos los tubos a 100 °C por 10 minutos y se leen en espectrofotómetro a 490 nm.

IV.4.3.- Muestra problema:

Las muestras problemas se tratan de igual forma que las de referencia, y el valor de su absorbancia se interpola en la curva para determinar la cantidad de azúcares. Calcular los ug de azúcar/ml con base en el volumen de muestra empleado.

IV.5.- OBTENCION DE LIQUIDO DE ASCITIS (Ref. 2):

IV.5.1.- Soluciones:

-Medio Dulbecco (DEM) suplementado con nutrientes:

-Suero fetal bovino descomplementado a 56°C. 13%

L. glutamina 1%

Glicina 0.2%

Penicilina 1000 000 U 0.25%

Gentamicina 0.18%

2-mercaptoetanol 0.050%

Se agregan al DEM todos los nutrientes en condiciones de máxima esterilidad utilizando una campana de flujo laminar.

-Pristane comercial

IV.5.2.- Material biológico:

-Ratones hembras de la cepa BalB/c de 20 g c/u.

-Células productoras de anticuerpos monoclonales contra GM de las líneas 2D8 ,3H6 y 3G7.

-Células de la línea murina Sp2/O.

IV.5.3.- Procedimiento:

-Las células productoras de anticuerpos monoclonales contra GM de las líneas 2D8, 3H6 y 3G7, fueron cultivados en

botellas de 50 y 80 cm con medio DEM suplementado hasta su fase logarítmica de crecimiento.

-Las células fueron cosechadas, se mezclaron con pristane e inocularon 1×10^6 células híbridas a ratones de la cepa BalB/c hembras 0.5 ml/ratón por vía intraperitoneal.

-Dos semanas después de la inoculación de las células se obtuvo el líquido de ascitis por punción peritoneal, centrifugando para clarificar la solución.

-Se determinó el título de anticuerpos por el método de ELISA.

IV.6.- OBTENCION DE ANTISUERO DE CONEJO (ref. 19):

IV.6.1.- Antígeno:

Se emplearon GM resuspendidas en S.S.F. y emulsificados con adyuvante completo de Freud, a fin de aumentar su antigenicidad.

IV.6.2.- Inmunización:

Se inmunizaron dos conejos cepa Nueva Zelanda por vía subcutánea, cada semana durante un mes y posteriormente cada 15 a 30 días durante cuatro meses. En cada inoculación se aplicó 1 ml de la emulsión, conteniendo 1 mg de GM.

IV.6.3.- Suero:

La sangre se obtuvo de la vena marginal de la oreja. Se dejó

reposar 2 hrs a temperatura ambiente, se despredió el coágulo y se mantuvo en refrigeración para favorecer su contracción. Después, se separó el suero con pipeta Pasteur, se depositó en viales con azida de sodio y se almacenó a -40°C , hasta su uso.

IV.7.- DOBLE INMUNODIFUSION: (Ref. 20):

IV.7.1.- Soluciones:

-Agar o agarosa al 1.5%: Disolver perfectamente por calentamiento 1.5 g de agar en 100 ml de S.S.F. al 0.85%. Añadir azida de sodio 0.01%.

-Solución colorante: Disolver en 180 ml de etanol, 2 g de azul brillante de Coomassie añadir 40 ml de ácido acético y 180 ml de agua destilada mezclar perfectamente y filtrar.

-Solución decolorante: Mezclar perfectamente 180 ml de etanol, 40 ml de ácido acético y 180 ml de agua destilada.

IV.7.2.- Preparación de la placa:

-Colocar placas de vidrio de 25 x 75 mm en una superficie plana y nivelada, y distribuir en cada una 3.5 ml de la solución al 1.5% de agar caliente. Dejar solidificar.

-Perforar en el gel el número de horadaciones necesarios de acuerdo a la cantidad de muestras. Llenar las horadaciones

con los antígenos y antisueros, empleando capilares diferentes.

-Poner un papel filtro dentro de una caja de Petri y humedecerlo con agua destilada, para emplearla como cámara húmeda. Colocar cada placa dentro de una caja y mantener a temperatura ambiente.

-Examinar periódicamente el desarrollo de las bandas de precipitación, y cuando este sea óptimo lavar las placas para remover las proteínas no reaccionantes, para lo cual, se coloca la placa en un recipiente con solución salina 0.3 M, realizando varios cambios por un periodo de 2 días y posteriormente se ponen en S.S.F. 0.15 M por otros 2 días.

-Colocar sobre el gel una pieza de papel filtro del mismo tamaño con perforaciones que coincidan con los pozos del gel. Dejar secar toda la noche a temperatura ambiente.

-Remover el papel filtro y teñir durante 20 minutos.

-Eliminar el exceso de colorante transfiriendo las placas a un recipiente con solución decolorante. Cambiar 2 a 3 veces la solución por un periodo de 20 a 40 minutos.

-Secar las placas con aire, en posición vertical.

IV.8.- TÉCNICA DE ELISA: (Ref. 49):

IV.8.1.- Soluciones:

-Amortiguador de carbonatos pH 9.5:

Carbonato de sodio 7.0 g

Bicarbonato de sodio 2.8 g

Agua destilada 1 l

Disolver, ajustar el pH a 9.5 con hidróxido de sodio y aforar a 1 l con agua destilada.

-PBS pH 7.4:

Cloruro de sodio 0.15 M 8.7 g

Fosfato de sodio monobásico 2.7 g

Fosfato dibásico de sodio 0.4 g

Agua destilada 1 l

Disolver todos los reactivos, ajustar el pH con hidróxido de sodio 1 M y aforar a 1 l con agua destilada.

-Solución de lavado:

PBS pH 7.4 100 ml con Tween 20 0.1ml

-Solución bloqueadora PBS-leche 5%:

PBS pH 7.4 100 ml

Leche descremada 5 g

Disolver perfectamente los dos reactivos.

-Amortiguador de citratos pH 5.6

Citrato de sodio 29 g

Acido cítrico 4.1 g

Agua destilada 1 l

Disolver los reactivos en 200 ml de agua destilada y, ajustar el pH a 5.6 con ácido clorhídrico 1 M, aforar a 1 l.

-Sustrato para peroxidasa (solución de revelado):

o-fenilendiamina (OPD) 6 mg

Buffer de citratos pH 5.6 12 ml

Peróxido de hidrógeno 50 ul

Disolver perfectamente los reactivos. Prepararse esta solución en el momento de su uso.

-Acido sulfúrico 2 N para detener la reacción.

-Conjugado de anti-inmunoglobulinas humanas polivalente (IgA, IgG e IgM) comercial.

-Conjugado de inmunoglobulinas humanas anti-IgA, anti-IgG y anti-IgM.

-Conjugado de inmunoglobulinas polivalente de conejo (anti-IgA, anti-IgM y anti-IgG) comercial.

-Conjugado de inmunoglobulinas polivalente de ratón (anti-IgA, anti-IgG y anti-IgM) comercial.

-Suero de pacientes con diagnóstico de absceso hepático

-Sueros de conejo anti-GM y líquido de ascitis de ratón de las líneas 2D8, 3H6 y 3G7 (monoclonal).

-Suero humano normal, suero de conejo normal, y células SP2 que se utilizan como controles.

IV.8.2.- Preparación de la placa de ELISA:

El antígeno a utilizar, en este caso GM 20 mg/ml se diluye en amortiguador de carbonatos pH 9.5 y se coloca en los pozos de

la placa (100 ul/pozo), se incuba 1 hora a 37°C y toda la noche a 4°C.

b).- Se lava la placa con PBS-tween al 0.1% de 4 a 8 veces.

c).- Se bloquea la placa con PBS-leche al 5%, para evitar el desprendimiento del antígeno 2 hrs a 37°C, 300 ul/pozo.

d).- Se lava la placa de 4 a 8 veces con PBS-tween al 0.1%.

e).- Se pone el primer anticuerpo (en este caso los sueros de pacientes con diagnóstico de AHA diluidos 1:50; suero de conejo anti-GM diluciones: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, y líquido de ascitis de ratón (monoclonales) de las líneas 2DB, 3H6 y 367 con diluciones 1: 50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200. Se colocan en cada pozo 100 ul y se incuban 1 1/2 hrs a 37°C. También se ponen los siguientes controles: suero humano normal dilución 1:100, suero de conejo normal dilución 1:100, y células SP2 dilución 1:10. Todas estas diluciones se hicieron en PBS-leche.

f).- Se lava la placa de 8 a 10 veces con PBS-tween al 0.1%.

g).- Se adiciona el segundo anticuerpo (en este caso conjugado polivalente anti-humano acoplado a peroxidasa en una dilución 1:200, conjugado anti-conejo dilución 1:2000 y conjugado anti-ratón dilución 1:100, las diluciones se hicieron en PBS-leche). Colocar 100 ul/pozo. Incubar 1 hr a 37°C.

h).- Lavar la placa de 4 a 8 veces con PBS-tween al 0.1 %.

i).- Añadir la solución de revelado (DPD, peróxido de hidrógeno y amortiguador de citratos pH 5.6) 100 ul/pozo, incubar a temperatura ambiente 15 minutos al resguardo de la luz.

j).- Parar la reacción utilizando el ácido sulfúrico 2 N una gota por pozo. Leer a 490 nm utilizando un lector de ELISA.

IV.9.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA: (Ref. 19, 31, 34, 55):

IV.9.1.- Soluciones:

1).- Solución Stock:

a).- Acrilamida Bis (30% T- 2.6% C) PAGE

Acrilamida 30 g

n'n metilenbisacrilamida 0.8 g

Agua destilada 100 ml

Disolver en agua, llevar a 100 ml y filtrar en papel Whatman #1 ederal (#4) y mantener en la oscuridad a 4 °C.

b).- Amortiguador de gel separador: 1.5 M tris-HCl pH 8.8:

Tris base 18.15 g

HCl 1 M aproximadamente 48 ml

Ajustar a pH 8.8 con HCl 1 M y aforar a 100 ml con agua destilada.

c).- Amortiguador de gel introductor: Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

Tris base 3.0 g

Agua destilada 50 ml

Ajustar a pH 6.8 con HCl 1 M, llevar a 50 ml con agua destilada.

d).- 25 ml tris 0.125 M pH 6.8

SDS 2 g

Glicerol 10 ml

2-mercaptoetanol 250 ul

Azul de bromofenol al 4% 0.1 ml

A 25 ml de tris se le agrega el SDS, se adicionan los demás reactivos mezclándolos perfectamente.

e).- Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%

SDS 10 g

Agua destilada 100 ml

Disolver y aforar a 100 ml con agua destilada.

f).- Persulfato de amonio (APS) 10%

APS 0.1 g

Agua destilada 1.0 ml

Se disuelve perfectamente el APS con el agua destilada.

g).- Amortiguador de corrimiento

Tris base 18 g

Glicina 86.4 g

SDS 6.0 g

Ajustar a pH 8.3 y aforar a 6 lts con agua destilada.

h).- Amortiguador de muestras sólidas

Tris pH 6.8 12.5 ml

SDS 1.0 g

Glicerol	5.0 ml
2-mercaptoetanol	2.5 ml
Azul de bromofenol	0.05 ml

Disolver y mezclar perfectamente.

i).- Rojo de Ponceau 6 R I.C

Acido tricloroacético 7.5 g

Rojo de Ponceau 500 mg

Agua destilada 100 ml

Disolver el ácido tricloroacético en 100 ml de agua destilada y agregar el rojo de Ponceau, mezclar hasta su completa disolución.

j).- Solución fijadora:

Metanol 400 ml

Acido acético 70 ml

Agua destilada 530 ml

Mezclar perfectamente todas las soluciones.

k).- Solución para tefir:

Metanol 50% 454 ml

Acido acético 46 ml

Azul de Coomassie r-250 1.25 g

Agitar 1 hora para disolver el colorante y filtrar.

l).- Solución desteñidora:

Metanol 300 ml

Acido acético 70 ml

Agua destilada 630 ml

Mezclar perfectamente todas las soluciones y guardar en un

frasco color ámbar.

11).- Amortiguador de transferencias:

Metanol (20%) 20 ml

Tris base (25mM) 3.025 g

Glicina (192mM) 14.4 g

Agua destilada 800 ml

mezclar todos los reactivos perfectamente.

m).- Solución reveladora de transferencias:

p-4-cloro-alfa-naftol 30 mg

Metanol 10 ml

PBS pH 7.4 50 ml

Peróxido de hidrógeno 30 ul.

Disolver el P-4-cloro-alfa-naftol en el metanol, agregar el

PBS ph 7.4 y el peróxido de hidrógeno, mezclar perfectamente.

Preparar al momento de su uso.

n).- TEMED comercial.

o).- Glicerol comercial.

p).- 2-mercaptoetanol comercial.

q).- Pesos moleculares comerciales.

r).- Conjugado anti-humano polivalentes (IgA, IgM e IgG)

comercial. Conjugado anti-conejo polivalente (IgA, IgG e

IgM) comercial. Conjugado anti-ratón monoclonal IgG

comercial.

s).- Soluciones para la tinción de plata:

-Glutaraldehido (25%) al 10% .

Medir 40 ml de glutaraldehido y llevar a 100 ml con agua deionizada.

-Nitrato de plata:

Colocar 1.4 ml de hidróxido de amonio en 21 ml de hidróxido de sodio (0.1 N); adicionar 4 ml (19.4%) de nitrato de plata, llevar a 100 ml con agua deionizada.

-Revelado:

Pesar 50 mg de ácido cítrico y disolverlo con agua deionizada, aforar a 1 l, adicionar 500 ul de formaldehido.

-Acido acético 1%.

t).- Soluciones para la transferencia:

-Amortiguador de transferencia pH 8.3

Tris base 9.075 g

Glicina 43.2 g

Metanol 600 ml

Agua destilada 2400 ml

Disolver los reactivos en el metanol y agregar el agua destilada agitar hasta su completa disolución.

-Solución de bloqueo: PBS-leche al 5%

PBS pH 7.4 100 ml

Leche descremada 5 g

Disolver la leche en el PBS.

-Sustrato o solución de revelado:

p-4-cloro-1-naftol 0.6 mg

Metanol 2.0 ml

PBS pH 7.4 3ml

Peróxido de hidrógeno (30%) 50 ul

Disolver el p-4-cloro-1-naftol con el metanol, tomar 1 ml de esta solución y agregar 3 ml de PBS pH 7.4 . Adicionar el peróxido de hidrógeno. Esta solución se prepara en el momento de usarse.

-Solución para teñir:

Azul de Coomassie 0.05 g

Isopropanol 100 ml

Disolver completamente el colorante en el isopropanol.

-Solución decolorante:

Isopropanol 1000 ml

Acido acético 400 ml

Agua destilada 4600 ml

Mezclar perfectamente todos los reactivos.

IV.9.2.- Preparación de las placas:

-Lavar todo el material a utilizar perfectamente con detergente. Enjuagar con agua corriente y luego con agua destilada. Limpiar las placas de vidrio con metanol.

-Colocar las placas de vidrio en su base y verificar que los bordes están perfectamente sellados. Las dimensiones de las placas utilizadas son de 10 x 8 x 2 mm y los separadores tienen un grosor de 0.75 mm.

-Nivelar la base sobre una superficie plana. Aplicar el gel de separación entre las placas de vidrio, hasta una altura de 6.0 cm. En el espacio restante estratificar agua destilada para evitar que se deshidrate el gel y facilitar que polimerice horizontalmente. Dejar reposar 30 minutos.

-Eliminar el agua destilada y colocar el peine que formará los sitios de aplicación de muestra. Aplicar el gel de introducción en el espacio libre entre el gel separador y el peine, hasta el límite superior de las placas. Dejar polimerizar de 15 a 30 minutos.

-Retirar el peine y eliminar el exceso de acrilamida utilizando una aguja sin punta. Sellar perfectamente. Poner en la cámara de electroforesis el amortiguador de corrimiento correspondiente a una temperatura de 4°C.

IV.9.3.- Preparación de las muestras:

-Medir con jeringa de Hamilton 750 ul de GM que tienen una concentración de 4.0 mg/ml de proteínas y añadir 375 ul de amortiguador para GM. Mezclar, calentar 5 minutos y después agregar 38 ul de 2-mercaptoetanol. Aplicar a la placa 25 ul/pozo.

IV.9.4.- Electroforesis:

-Depositar amortiguador de corrimiento en la cámara inferior, colocar las placas, llenar con el amortiguador la parte superior de la cámara y colocar las muestras.

-Conectar el sistema a una fuente de poder de corriente

constante, mantener a 200 volts y 63 mA/placa durante 2 hrs hasta que el frente del azul de bromofenol, llegue a 5 mm por arriba del límite inferior del gel.

-Una vez finalizado el corrimiento desconectar el sistema y separar las placas.

IV.9.5.- Tinción protéica con azul de Coomassie y preservación del gel.

-En un recipiente de tamaño adecuado colocar el gel y agregar solución fijadora cubriendolo completamente. Fijar 10 hrs.

-Eliminar la solución fijadora y tratar el gel durante una hr con la solución teñidora.

-Eliminar el colorante y aplicar la solución desteñidora. Realizar los cambios necesarios para obtener la coloración y transparencia del gel deseadas.

IV.9.6.- Tinción protéica con plata

-Luego de corrimiento el gel se coloca en un recipiente completamente limpio y sin manchas. Enseguida se prefiija con metanol al 50 % y ácido acético al 10% por 30 minutos.

-Lavar con una mezcla de etanol al 5% y ácido acético al 7% con agitación (8 lavados de 15 minutos cada uno). Fijar con glutaraldehído al 10 % durante 30 minutos. Enjuagar con bastante agua deionizada toda la noche o por 2 hr con agitación para eliminar el glutaraldehído.

-Teñir con la solución de nitrato de plata de 10 a 15 minutos

aproximadamente. Lavar con agua deionizada por 1 hora en agitación, cambiando el agua (4 veces aproximadamente). Se revela el gel con la solución de ácido cítrico. Una vez que aparecen las bandas se para la reacción con ácido acético al 1%. Lavar el gel durante 1 hora con 3 cambios con agua deionizada.

IV.9.7.- Transferencia:

-Se monta el soporte para electrotransferencia con una de las placas, en ella se coloca una esponja húmeda y sobre ella un papel filtro grueso del tamaño de la esponja.

-Se retiran los geles de los vidrios con cuidado y se coloca el papel de nitrocelulosa (PNC) de 8 x 10 mm humedecido con amortiguador de transferencia durante 1 hora. El PNC se mantuvo hasta su colocación en amortiguador de transferencia.

-El gel de poliacrilamida se coloca encima del papel filtro, enseguida se pone el PNC sobre el gel de poliacrilamida y se marcan con lápiz, las puntas de inicio del gel. Con la ayuda de una pipeta Pasteur humedecida con el amortiguador de transferencia, se sacan las burbujas de aire y se quitan los pliegues que se hayan hecho entre el PNC y el gel.

-Se pone otro papel filtro de iguales dimensiones que el primero así como otra esponja humedecidos los dos con el amortiguador de transferencia.

-Se monta el sistema sobre la cuba de electrotransferencia en donde ya se encuentra el amortiguador de transferencia. Se

conectan los electrodos con la fuente de poder de voltaje constante aplicando una corriente de 100 v y 90 mA/placa. Se transfiere la muestra durante 2 hrs y se mantiene con un sistema de agua refrigerante.

-Cuando ha transcurrido el tiempo se retiran los PNC y se cortan en tiras. Los pesos moleculares se tifen.

-Una vez revelada la muestra, se cortan los PNC, se bloquean con PBS-leche al 5% toda la noche a 4°C, se lavan con PBS-tween al 0.1% durante 30 minutos y PBS pH 7.4 15 minutos, se mantienen en tubos con PBS pH 7.4 hasta el momento de su uso.

-Se seleccionan los PNC a usar y se incuban toda la noche a temperatura ambiente con las siguientes muestras:

1).- Sueros de pacientes con AHA titulados previamente por la técnica de Elisa en una dilución 1:50.

2).- Suero humano normal: 1:50

3).- Suero de conejo anti- GM: 1:100

4).- Anticuerpos monoclonales anti-GM de la clase 3G7 1:200

5).- Suero de conejo anti-LPPG: 1:100

Las diluciones de todas las muestras son en PBS-leche al 5%.

- Los PNC incubados se lavan con PBS-tween al 0.1% durante 40 minutos y con PBS pH 7.4 durante 20 minutos .

- A los PNC lavados se les adiciona los siguientes conjugados diluidos en PBS-leche al 5%:

1).- Suero de Pacientes con AHA y suero humano normal,

conjugado polivalente de inmunoglobulinas humanas diluidos 1:100.

2).- Suero de conejo anti GM y anti-LPPG, conjugado de conejo polivalente diluido 1:200.

3).- Anticuerpos monoclonales 3G7, conjugado de ratón polivalente diluido 1:200.

Se incuban 1 1/2 horas a 37 °C con agitación.

-Se lavan los papeles de nitrocelulosa con PBS-tween al 0.1% durante 40 minutos y con PBS pH 7.4 20 minutos.

-Una vez lavados, se adicionan 5 ml de la solución reveladora a cada PNC, hasta la aparición de las bandas. Se lavan con agua destilada para eliminar el exceso de revelador.

-Se secan los PNC a temperatura ambiente.

VI.- RESULTADOS

V.1.- Contenido de azúcares y proteínas extraídas de glucoproteínas de membranas totales de E. histolytica de 6000×10^6 trofozoitos con un amortiguador de fuerza iónica alta:

Extractos	Azúcares	Proteínas
No.	mg/ml	mg/ml
1	2.3	4.0
2	0.459	3.6
3	0.140	2.1
4	0.250	1.0

Relación proteínas/carbohidratos:

Extractos	Azúcares	Proteínas	Cantidad
No.	mg/ml	mg/ml	mg/ml
1	4.0	2.3	1.739
2	3.6	0.459	7.840
3	2.1	0.140	15.0
4	1.0	0.250	4.0

V.2.- Resultados por la técnica de ELISA de 20 sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano en presencia de un conjugado policlonal de anti-inmunoglobulinas humanas (IgA, IgG e IgM):

Pacientes	Resultados	Control
1	1.982	0.002
2	1.982	0.001
3	1.406	0.007
4	1.680	0.002
5	2.000	0.000
6	1.108	0.006
7	1.100	0.012
8	1.519	0.003
9	1.230	
10	1.513	
11	1.328	
12	1.120	
13	1.552	
14	1.960	
15	1.257	
16	1.093	
17	0.619	
18	1.293	
19	1.314	
20	1.293	

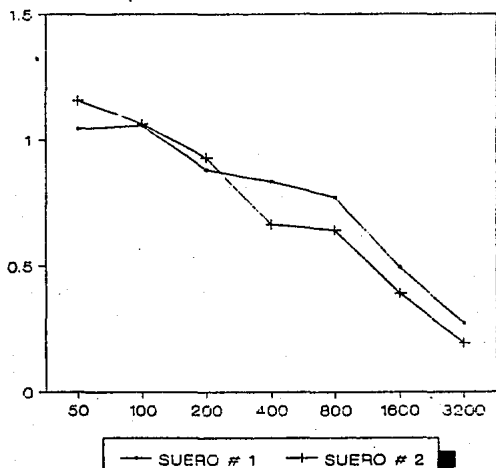
V.3.- Resultados por la técnica de ELISA del análisis con GM de 20 sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano en presencia de conjugados de inmunoglobulinas humanas por separado:

Pacientes	Anti-IgA	Anti-IgG	Anti-IgM	control
1	0.150	0.811	0.290	0.005
2	0.468	1.347	0.167	0.002
3	0.130	1.252	0.240	0.004
4	0.367	1.204	0.109	0.007
5	0.256	1.531	0.456	0.002
6	0.158	1.134	0.132	0.000
7	0.212	0.828	0.060	0.001
8	0.419	0.938	0.162	0.011
9	0.390	0.724	0.116	
10	0.204	1.248	0.061	
11	0.180	1.016	0.132	
12	0.263	0.521	0.336	
13	0.204	1.300	0.052	
14	0.310	1.288	0.356	
15	0.367	0.757	0.133	
16	0.149	0.625	0.400	
17	0.167	0.310	0.142	
18	0.209	0.600	0.484	
19	0.315	0.712	0.287	
20	0.280	0.620	0.393	

V.4.- Resultados por la técnica de ELISA de los títulos de los sueros de conejo anti-GM en diferentes diluciones:

Diluciones	Suero # 1	Suero # 2	Control
1:50	1.0445	1.1600	0.002
1:100	1.0580	1.0630	0.004
1:200	0.8820	0.9290	0.003
1:400	0.8340	0.6640	0.000
1:800	0.7710	0.6420	0.003
1:1600	0.4950	0.3920	0.000
1:3200	0.2710	0.1950	0.001

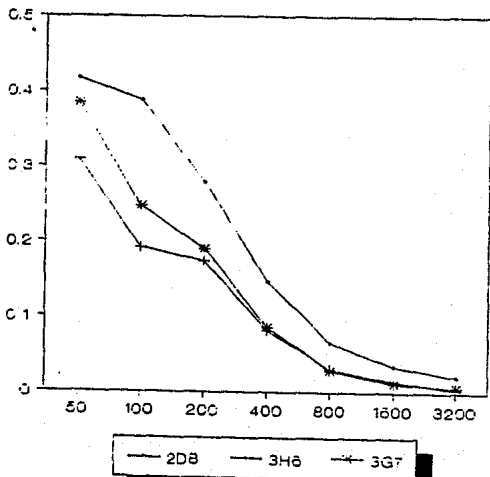
Gráfica # 1:



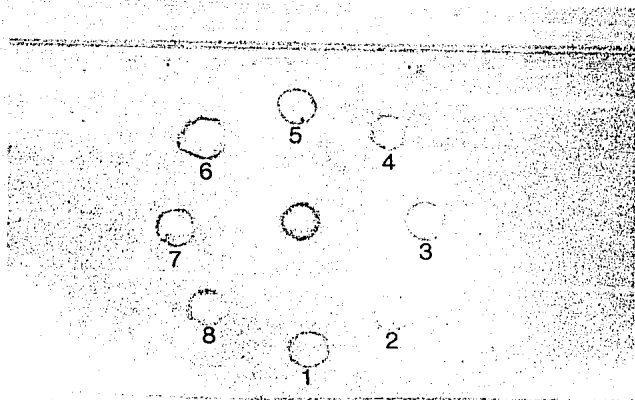
V.5.- Resultados por la técnica de ELISA de los títulos de líquidos de ascitis 2D8, 3H6 y 3G7 (monoclonales) en diferentes diluciones:

Diluciones	2D8	3H6	3G7	Control
1:50	0.417	0.309	0.384	0.003
1:100	0.388	0.192	0.247	0.002
1:200	0.279	0.174	0.190	0.004
1:400	0.147	0.082	0.086	0.002
1:800	0.066	0.031	0.029	0.001
1:1600	0.035	0.015	0.012	0.001
1:3200	0.021	0.005	0.007	0.000

Gráfica # 2:



V.6.- Resultados del reconocimiento a GM por la técnica de la doble inmunodifusión en gel de agarosa en cuyos pozos se colocaron diferentes sueros y antisueros como se indica en la figura No. 1:



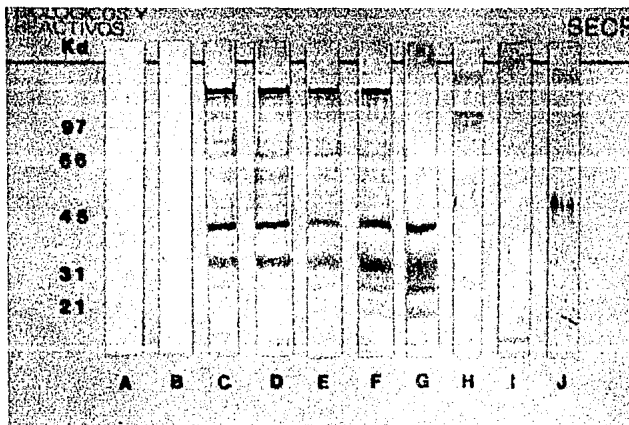
Pozo central: GM

- (1) Suero de paciente con diagnóstico de AHA
- (2) Suero de conejo anti-GM
- (3) Suero de paciente con diagnóstico de AHA
- (4) Suero de conejo anti-GM
- (5) Suero de paciente con diagnóstico de AHA
- (6) Suero humano normal (7) Suero de conejo normal
- (8) Suero de conejo anti-LPFG

V.7.- Resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida de las GM con sus pesos moleculares figura No. 2:



V.6.- Reconocimiento por inmunoelectrotransferencia de las GM con los siguientes anticuerpos (figura No.3 y figura No.4):



A.- Pesos moleculares

B.- Anticuerpos monoclonales contra E. histolytica de la clase 3G7

C.- Suero de paciente con diagnóstico de AHA #1

D.- Suero de paciente con diagnóstico de AHA #2

E.- Suero de paciente con diagnóstico de AHA #3

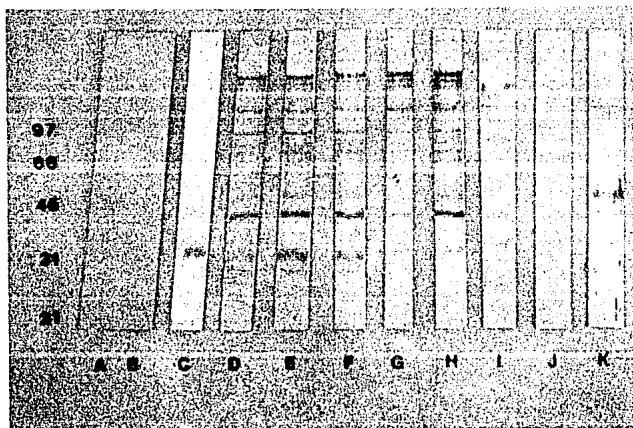
F.- Suero de paciente con diagnóstico de AHA #4

G.- Suero de paciente con diagnóstico de AHA #5

H.- Suero de conejo anti-GM.

I.- Suero humano normal

J.- Suero de conejo anti-LPFG.



A y B.- Pesos moleculares.

C.- Anticuerpos monoclonales contra *E. histolytica* de la clase 367.

D.- Suero de paciente con diagnóstico de AHA #6.

E.- Suero de paciente con diagnóstico de AHA #7.

F.- Suero de paciente con diagnóstico de AHA #8.

G.- Suero de paciente con diagnóstico de AHA #9.

H.- Suero de paciente con diagnóstico de AHA #10.

I.- Suero de conejo anti-GM

J.- Suero humano normal

K.- Suero de conejo anti-LPFG

VI.- DISCUSION

Previo a la extracción de GM totales (6000×10^5 trofozoitos de amibas) cultivadas axénicamente (páginas 28-30), fué necesario un lavado exhaustivo de dichos trofozoitos para eliminar los componentes del medio de cultivo que pudieran contaminar la muestra. Debido a la insolubilidad de las GM en sistemas acuosos neutros, se empleó un amortiguador de fuerza iónica alta. También se necesitó emplear un inhibidor de proteasas (página 25) debido a la intensa actividad hidrolítica que presentan las GM, por lo tanto, se trabajó con extractos de GM con actividad hidrolítica inhibida. Una vez obtenidos los extractos de GM, se procedió a determinar la concentración de las proteínas presentes en los mismos, utilizando el método de Lowry (página 27), que determina la concentración de la tirosina y el triptófano contenidos en las proteínas por el método colorimétrico. La determinación de azúcares contenidos en los extractos de GM, se realizó por el método colorimétrico fenol-sulfúrico (páginas 28, 29) ya que este método permite cuantificar azúcares totales y el contenido de azúcares en glucoproteínas. Al efectuar la determinación de la concentración de azúcares y proteínas en las GM extraídas (según resultados de la página 48), se pudo observar una mayor concentración de proteínas en relación a la concentración de azúcares. Estudios previos a este (47), concuerdan con los resultados obtenidos en estas determinaciones lo cual valida dichas determinaciones.

El método de ELISA es una técnica de muy alta sensibilidad y especificidad, siendo muy útil para demostrar antígenos o anticuerpos presentes a muy bajas concentraciones en diversos líquidos biológicos (49). Es por ello que es capaz de detectar anticuerpos séricos en sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano (49). Se analizaron 20 sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano los cuales se adicionaron a una placa previamente sensibilizada con GM obtenidas como se mencionó anteriormente. Dichos sueros se incubaron posteriormente, en un conjugado polivalente de inmunoglobulinas humanas (IgA, IgG e IgM), siendo el conjugado una anti-inmunoglobulina a la cual se le pega una enzima, en este caso la peroxidasa, cuya función principal es retener la mayor parte de la actividad inmunitaria y enzimática. Los resultados obtenidos indicaron que en 19 sueros se presentaron títulos mayores a 1, y solo uno de estos sueros presentó un título menor a 1, con respecto a los controles de suero humano normal cuyos títulos fueron de 0.000 a 0.012. Estos resultados inducen a inferir un reconocimiento importante hacia las GM por parte de los sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano, siendo esto indicativo de la presencia de anticuerpos hacia las GM. La reacción antígeno-anticuerpo, es retenida para su lectura posterior por la acción del conjugado polivalente, sin poder determinar, en esta fase del trabajo, si la retención antigénica es mediada con mayor intensidad, por alguno de los componentes del conjugado polivalente, por lo que la siguiente etapa de este trabajo,

consistió en utilizar una placa de ELISA previamente sensibilizada con GM, incubada con los sueros de los 20 pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano, añadiéndole posteriormente el conjugado por separado: IgA, IgG e IgM. Se observó que en los 20 sueros incubados con el conjugado IgG, se encontraron títulos mayores a 1 en 9 pacientes, menores a 1 en 10 pacientes y solo uno de ellos presentó un título menor a 0.5. En los sueros incubados con el conjugado IgA se encontraron títulos mayores a 0.3 en 7 pacientes y títulos menores a 0.3 en 13 pacientes. En los sueros incubados con el conjugado IgM se encontraron títulos mayores a 0.3 en 6 pacientes y títulos menores a 0.3 en 14 pacientes. Los controles para dichos sueros presentaron títulos de 0.011 a 0.000. Esto lleva a deducir que anticuerpos de la clase IgG se encuentran de manera predominante en dichos sueros (23), en comparación con los sueros incubados con los otros conjugados IgA e IgM.

La gráfica #1 presenta los valores obtenidos por el método de ELISA a diferentes diluciones de anticuerpos séricos de conejos previamente inmunizados con GM, al ponerse en contacto con las GM en presencia de un conjugado polivalente de conejo (IgA, IgG e IgM). Dicha gráfica presenta resultados positivos para GM con títulos elevados aún en diluciones bajas con respecto a los controles que fueron de 0.009 a 0.000. La gráfica #2 presenta los valores obtenidos por el método de ELISA, a diferentes diluciones de líquidos de ascitis de ratón (monoclonales), de las líneas 2D8, 3H6 y 3G7, los cuales son anticuerpos contra GM (2). Los líquidos

de ascitis de ratón se pusieron en contacto con las GM en presencia de un conjugado polivalente de ratón (IgA, IgG e IgM). Esta gráfica presenta resultados positivos para GM con respecto a los controles los cuales fueron de 0.004 a 0.000. Las dos gráficas indican que hay un reconocimiento importante hacia los anticuerpos séricos tanto de conejo como de ratón por parte de las GM.

Siguiendo la misma línea de investigación se procedió a preparar una placa semisólida de gel de agarosa como se indica en la página 31, efectuando horadaciones en dicha placa de la siguiente manera: una horadación central y 8 horadaciones periféricas a esta, adicionando posteriormente con un capilar al pozo central GM, y a los pozos periféricos, los sueros y antisueros descritos en la página 33. Una vez preparada la placa, se procedió a mantenerla en cámara húmeda hasta observar la formación de bandas de precipitación. Las bandas manifestadas con gran intensidad correspondieron a los pozos que contenían los sueros de conejo anti-GM, sueros de conejo anti-LPFG y de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano. Se observó que los controles, tanto del suero humano normal como el suero de conejo normal no formaron banda alguna. Estas bandas de precipitación observadas en la placa, se forman al difundir el contenido del pozo central y de algunos pozos periféricos en el gel de agarosa, al ponerse en contacto los antisueros y las GM, desencadenando una reacción antígeno-anticuerpo capaz de manifestarse en forma visual al formar un precipitado de

proteínas, propios de una reacción antigénica.

La técnica de la inmunoelectrotransferencia permite el análisis y separación de mezclas de proteínas, siendo un excelente método que permite observar, de manera visual, por medio de la transferencia del gel de poliacrilamida al papel de nitrocelulosa PNC (página 37), las glucoproteínas presentes en las muestras a analizar (19, 31, 34, 55). Este método permitió determinar el peso molecular, analizar las GM y además probar el reconocimiento de los anticuerpos que se encuentran presentes en sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano, sueros de conejo anti-GM y anti-LPFG y, además, los anticuerpos monoclonales (líquido de ascitis de ratón). En la figura 2 de la página 54 se observa en el gel de poliacrilamida, las bandas correspondientes a las glucoproteínas presentes en las GM así como el peso molecular, las cuales posteriormente, son transferidas al PNC para luego ponerse en contacto con los sueros y antisueros que se van a analizar. Como puede observarse en las figuras # 3 y # 4 de las páginas 55 y 56, los resultados obtenidos por este método, muestran a los anticuerpos monoclonales que se encuentran en una única banda de peso molecular que oscila en un rango de 30-35 Kd, mientras que los sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano se manifiestan en diversas bandas, pero reconocen en forma especial, la misma banda (30-35 Kd) que reconocen los anticuerpos monoclonales, como quedó demostrado en las figuras 3 y 4 de las páginas 55 y 56, a

diferencia de los sueros de conejo anti-GM y anti-LPPG, que aún cuando se observó la presencia de varias bandas en su análisis inmunolectroforético, no presentan reconocimiento especial hacia banda alguna.

VII.- CONCLUSIONES:

La amibiasis intestinal y extraintestinal, continua siendo un problema de salud pública a nivel mundial, es por esto, que las investigaciones a la búsqueda de nuevos elementos para su mejor comprensión, diagnóstico y tratamiento, continuan siendo de utilidad, especialmente si estos conocimientos conllevan a eleborar tratamientos tendientes a erradicar esta patología.

Este trabajo en sus primeras etapas, logró demostrar la presencia de una respuesta inmune de gran intensidad hacia las GM por parte de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano, así como de los sueros de ratones y conejos previamente inmunizados con GM, la cual fué evaluada a través de los métodos y resultados anteriromente descritos.

Las bandas formadas en los métodos de inmunodifusión e inmunolectrotransferencia nos hablan, por una parte, de una reacción antígeno-anticuerpo y por la otra, de la intensidad de la reacción inmune, la cual estará en relación directa con la manifestación visual del tamaño de dichas bandas. En este mismo marco conceptual, podemos evaluar las reacciones antígeno-anticuerpo, manifestadas por los alto títulos obtenidos por la técnica de ELISA. Estos resultados nos hablan del reconocimiento importante de los sueros tanto de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano como de conejos y ratones inmunizados hacia las GM.

El resultado obtenido por el método de la inmunolectrotransferencia es de gran importancia, ya que la identificación de la banda de un peso molecular aproximado 30-35 Kd, es un evento que tiene lugar al ponerse en contacto los anticuerpos monoclonales con los antígenos de GM, dando como resultado esta banda, misma que también en forma especial reconocen los sueros de los pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano, al darse la misma reacción inmunológica y que puede proveer de bases para la purificación de dicha banda que permita el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y lleve a obtener una respuesta inmune y, de esta manera, en un futuro próximo a la elaboración de una vacuna.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABIDYE, A.A., LEWIS, E, A., y McFARLAND, H., Clinical evaluation of immunoglobulins in amoebiasis. Immunology. 1 ed ed. Hoeber. Nueva York. 1972. Pág: 23, 937.
- 2.- AGUNDIS, C., ISIBASI, A., ORTIZ, V., REYES, J.L., PANIAGUA, J., RAMIREZ, A., KUMATE, J., Obtención de anticuerpos monoclonales contra glicoproteínas de membrana externa de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. 21 (suppl 1). México. 1990. Pág: 15-21.
- 3.- ALEY, S.R., SCOTT, W.A., and COHN, Z.A., Plasma membrane of E. histolytica. J. Exp. Med. 152 (suppl: 12). IMMS. México. 1980. Pág: 160-174.
- 3.- BARNES, R.D., Zoología de los invertebrados. 3a ed. ed. Interamericana. México. 1977. Pág: 32-33.
- 5.- BELTRAN, F., BIAGI, F., ORTEGA, P. S., and RIVAS, C., Observaciones sobre la reacción de inmunofluorescencia y la reacción de inmovilización con E. histolytica. Rev. gastr. Méx. 30 (suppl:1). IMSS. México. 1965. Pág: 1.
- 6.- BIAGI, F., and BUENTELLO, L., Inmobilization reaction for diagnosis of amebiasis. Exp. Parasitol. 11 (suppl:19). IMSS. México. 1961. Pág: 188.
- 7.- BLOOMFIEL, A.L., A. Bibliography of internal medicine: Amebic dysentery. D. Chronic. Dis. 5 (vol:4). Lab. Inv. USA. 1957. Pág:235.

8.- BOCKUS, H., Gastroenterologia. 2a ed. Edit. Salvat México. 1970. Pág:261.

9.- BOONPUKCAVING, S., and NAIRN, R.C., Serological diagnosis of amoebiasis by immunofluorescence. J. Clin. Path. 20 (suppl:23). Lab. Inv. London. 1967. Pág: 875-878.

10.- BOS, H. J., The problem of pathogenicity in parasitic Entamoeba. Acta Leidensia, 40 (suppl: 1). Leiden Alem. Alemania. 1973. Pág: 1-112.

11.- BROWN, J. A. H., and WHITBY, J. L., An immobilization test for amoebiasis. Clin. Path. 8 (suppl:2). Lab. Inv. London. 1955. Pág:245.

12.- CALDERON, J., MUNOZ, M., ACOSTA, H. M., Surface Redistribution and release of antibody-induced Caps in Entamoeba. J. Exp. Med. 151 (suppl. 1). IMSS. México. Pág: 184-193.

13.- CALDERON, J., and TOVAR-GALLEGOS, R., Resistance to immune lysis induced by antibodies in E. histolytica. Arch. Inv. Méd. 11 (suppl.1). IMSS. México. Pág: 241-243.

14.- CROOS, G. A. M., Identificación, purificación and propiedades of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei. Parasitol. 71 (suppl: 7). Lab. Inv. USA. 1975. Pág: 393-417.

15.- DIAMOND, L. S., Axenic cultivation of E. histolytica: progress and problems. Arch. Inv. Méd. 11 (suppl: 1), IMSS. México. 1961. Pág: 47-54.

16.- DIAMOND, L. S., HARLOW, D. R., and CUNNICK, C. C., A new medium for axenic cultivation of E. histolytica and other Entamoeba. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72 (Suppl:4). Lab. Inv. London. 1975. Pág: 431-432.

17.- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. and SMITH, J., Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 2 ed. Davis Co. USA. 1956. Pág: 350.

18.- EATON, R. D. P., MEEROVITCH, E., and COSTERTON, J. W., The functional morphology of pathogenicity in E. histolytica. Parasit. 64 (suppl:4). Ann. Trop. Med. Amsterdam. 1970. Pág: 299-304.

19.- FEHRNSTEOM, H., MOBERG, U., SDS and conventional polyacrylamide gel electrophoresis with LKB 2117 Multipor. Aplication note. 306 (suppl:36). LKB Sweden. Suecia. 1977. Pág: 1-15.

20.- GARVEY, J. S., CREMER, N. E., and SUSDRORF, D. H., Methods in immunology. A laboratory text for instruction and research. 3a. ed. W. A. Benjamin, Inc., London. 1977. Pág: 7-38, 183-185, 313-321, 328-335.

21.- GUERRANT, R. L., The global problem of amebiasis. Infect. Dis. 8 (suppl:15). IMSS. México. 1986. Pág: 218.

- 22.- GUTIERREZ. G., LUDLOW, A., ESPINOSA, G., HERRERA, S., MUNOZ, O., RATTONI, N., y SEPULVEDA, B., National serologic survey. II. Search for antibodies against E. histolytica in México. Proceeding of the international conference on amebiasis. Arch. Inv. Med. 11 (suppl: 31). IMSS. México. 1976. Pág: 609.
- 23.- JUNIPER, K., WORREL, C. L., MINSHEW, M. C., ROTH L. S., CYPERT, H., y LLOYD, R. E. Serological diagnosis of amebiasis, Am. J. Trop. Med. Hyg. 21 (suppl:11). Lab. Inv. Amsterdam. 1972. Pág: 157.
- 24.- KEAN, B. H., A history of amebiasis. In amebiasis human infection by E. histolytica. 1 ed. ed. John Wiley and Sons. U.S.A. 1988. Chap: 1
- 25.- Khan, Z. A., and Meerovitch, E.. A comparative study of antigens of some of the "histolytica-type" strains of Entamoeba. A qualitative and quantitative evaluations of antigens by indirect hemagglutination, gel-precipitation, and immunoelectrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 17 (Suppl:4). Lab. Inv. Amsterdam. 1968. Pág: 528-539.
- 26.- KHAN, Z. A., and MEEROVITCH, E., Studies on the purification of E. histolytica antigens by gel filtration I some physicochemical properties of the isolated fractions. Can. J. Microbiol. 16 (Suppl: 14). Lab. Inv. London. 1970. Pág: 485-498.
- 27.- KRETSCHMER, R. R., and LOPEZ-OSUNA, M., Estudios sobre

inmunidad celular con antígeno amibiano axénico y sus fracciones. Arch. Invest. Med. 19 (suppl.1). IMSS. México. 1971. Pág: 269.

28.- KRETSCHMER, R., SEPULVEDA, B., ALMAZAN, A., and GAMBOA, F., Intradermal reactions to an antigen (histolyctin) obtained from axenically cultivated E. histolytica. Trop. geogr. Med. 4 (Suppl:15). IMSS. México. 1972. Pág: 24, 275.

29.- KRUPP, I. M., Definition of the antigenic pattern of E. histolytica immunoelectrophoretic analysis of the variations of patient response to amebic disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26 (suppl: 19). Lab. Inv. Amsterdam. 1977. Pág: 387-392.

30.- KUDO, R. R., Protozoología. 5 a. ed. edit. continental. México. 1976. Pág: 416-421.

31.- LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage t4. Nature. edit. Academic Press, Inc. London. 1970. Pág: 680-685.

32.- LANDA, L., CAPIN, R., and GUERRERO, M. Estudios sobre inmunidad celular en la amibiasis invasora. In proceeding of international conference on amebiasis. Arch. Inv. Med. 16 (suppl: 17). IMSS. México. 1976. Pág: 654.

33.- LAWSON, E. G., HEDLUND, B. E., ERICSON, M. E., MOOD, D. A., LITMAN, G. W., and MIDDAGH, R., Effect of carbohydrate on protein solubility. Arch. Biochem. Biophys.

- 220 (Suppl: 2). Lab. Inv. London. 1983. Pág: 572-575.
- 34.- LEHNIGER, A. L., Proteínas: purificación y caracterización. En bioquímica. las bases moleculares de la estructura y función celular. 2a. ed. Omega, Barcelona 1981. Pág: 161-187.
- 35.- LOWE, C. Y., and MAEGRATH, B. C., Electron microscopy of axenic strain of E. histolytica. Ann. Trop. Med. 64 (suppl: 23). Parasitol. Amsterdam. 1970. Pág: 293-298.
- 36.- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, U. J., FARR, A. L., and RANDALL, R. J. Proteina measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 (suppl:35). Lab. Inv. Suecia. 1951. Pág: 263-275.
- 37.- LUDVIK, J., and SHIPSTONE, A. C., The Ultrastucture of E. histolytica. Bull. Org. Mond. 43 (suppl: 21). Lab. Inv. Sante. 1970. Pág: 301-308.
- 38.- MARTINEZ, B. M., Manual de parasitología médica. 1 ed. La prensa médica Mexicana. México. 1957. Pág: 55.
- 39.- Martinez, B. M., Historical introduction. In amebiasis Martinez-Palomo, A. 7 ed. edit. Elseiver Am. 1986. página: 1
- 40.- MARTINEZ-PALOMD, A., The biology of E. histolytica 3a ed. John Wiley and Sons, Ltd. Great Britain. 1982. Pág: 161.
- 41.- MUNOZ, M. L., ACOSTA DEL VALLE, H., y CALDERON, J., Redistribución de antígenos superficiales de E. histolytica

y su caracterización inmunoquímica. Arch. Inv. Med. 9 (suppl 1), IMSS. México. 1978. Pág: 183-189.

42.- ORTIZ-ORTIZ, L. L., CAPIN, W. R., SEPULVEDA, B., and ZAMACONA, G., Activation of the alternative pathway of complement by E. histolytica. Clin. Exp. Immunol. 34 (suppl: 3). IMSS. México. 1978. Pág: 10-18.

43.- PARKHOUSE, M., CID, M. A., y CALDERON J., Identificación de antígenos de membrana de E. histolytica con anticuerpos de pacientes de amibiasis. Arch. Inv. med. 17 (suppl: 10). IMSS. México. 1978. Pág: 211-218.

44.- PATTERSON, M., HEALY, G.R., and SEPULVEDA, B., Determinación de inmunoglobulinas del suero en pacientes con amibiasis invasora. Arch. Invest. Med. 2 (suppl 1). IMSS. México. 1970. Pág: 597.

45.- PEREZ, T. R., LARRALDE, C., KRETSCHMER, R. R., Inmunopatología. 1a ed. La prensa medica Mexicana. México. 1968. Pág: 16-116.

46.- PINTO DA SILVA, P., MARTINEZ-PALOMO, A., and GONZALEZ-ROBLES, A. Membrane structure and surface coat of E. histolytica. Topochemistry and dynamics of the cell surface: Cap formation microexudate. J. Cell, Biol. 64 (Suppl: 43). Lab. Inv. Amsterdam. 1975 Pág: 538-550.

47.- RAMIREZ, M. C., Aislamiento, purificación parcial y caracterización de antígenos de de complejos solubles de E. histolytica. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de

química. México 1986. pags: 6-29.

48.- SANCHEZ, R. M., Antigenos de E. histolytica. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de química. México. 1988. Pág: 7-35.

49.- SANTOS, A. L., HERNANDEZ, L. J., QUESADA, P. F., ESTRADA, P. S., Estandarización del inmunoanálisis enzimático. Infectología. 4 (suppl: 1). IMSS. México. 1986. Pág: 18-22.

50.- SARGEANT, P. G., WILLIAMS, L. E., BHOJNANI, R., CAMPOS, J. E., and GOMEZ, A., The epidemiology of E. histolytica in a rural and urban area of México, A pilot survey II. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 74 (Suppl: 48). Lab. Inv. London. 1982. Pág: 653-656.

51.- SARGEANT, P. G., WILLIAMS, J. E., KUMATE, J., and JIMENEZ, E., The epidemiology of E. histolytica in México City. A pilot survey I. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 74 (suppl: 34). Lab. Inv. London. 1980. Pág: 653-656.

52.- SEPULVEDA, B., CHEVEZ, A., ITURBE-ALESSIO, I., ORTIZ-ORTIZ, L., Efecto de la gamaglobulina inmune antiambiiana sobre el trofozoito de E. histolytica. Arch. Inv. Med. 4 (suppl 1). IMSS. México. 1973. Pág: 79-86.

53.- SERRANO, R., DEAS, J. E., and WARREN, L. G., E. histolytica: Membrane fractions. Exp. Parasitol. 41 (suppl: 23). IMSS. México. 1977. Pág: 348-370.

- 54.- WALSH, J. A., Amebiasis in the world. Arch. Inv. Med. 17 (suppl 1). IMSS. México. 1986. Pág: 385-389.
- 55.- WEBER, K., and OSBOR, M., The reliability of molecular weight determinations by Dodecil sulfate-polyacrilamide de gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244 (suppl: 78). Lab. Inv. Suecia. 1967. Pág: 4406-4412.
- 56.- WITTNER, M., and ROSENBAUM, R. M., Role of bacteria in modifying virulence of E. histolytica. Studies of amebae from axenic cultures. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19 (suppl: 17). Lab. Inv. Amsterdam. 1970. Pág: 755-761.