

11261
2ej
23

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

COMPARACION INMUNOQUIMICA DE CUATRO ANTIGENOS DE NATURALEZA
POLISACARIDICA EXTRAIDOS DE TROFOZOITOS DE *Entamoeba histolytica*.

TESIS DE POSTGRADO

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
AREA: INMUNOLOGIA

Presenta:

MA. DOLORES RUIZ PUENTE

México, D. F.

1987

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

INDICE.

CONTENIDO	PAG.
INTRODUCCION	
Definición	1
Antecedentes históricos	1
Entamoeba histolytica	1
La enfermedad	1
Composición bioquímica de la membrana de los trofozoitos de E. histolytica	3
Inmunología de la amibiasis	4
1. Caracterización de antígenos amibianos	4
2. Localización subcelular de antígenos amibianos	5
3. Reacciones inmunes humorales	5
4. Reacciones inmunes celulares	6
5. Inducción de inmunidad protectora	7
OBJETIVO	
MATERIAL Y METODOS	
1. Cepa amibiana	9
2. Métodos de extracción de antígenos polisacarídicos	9
2.1. Método de Freeman-Staub	9
2.2. Método de extracción por fenol-agua	9
2.3. Método fenol-agua modificado	11
2.4. Extracción del antígeno crudo de trofozoitos de E. histolytica	11
3. Composición química de las fracciones obtenidas	11
3.1. Determinación de azúcares neutros	11
3.2. Determinación de azúcares aminadas	15
3.3. Determinación de fosfatos	15
3.4. Determinación de proteínas	15
4. Técnicas Inmunoquímicas	
4.1. Doble inmunodifusión	15
4.2. Técnica de cohetes de Laurell	16
4.3. Inmunolectroforesis bidimensional	16
4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida de las diferentes fracciones polisacarídicas	18
4.5. Cromatografía de exclusión molecular	19
4.6. Análisis inmunoenzimático (ELISA)	20
RESULTADOS	
2. Doble inmunodifusión	21
3. Método de cohetes de Laurell	21
4. Inmunolectroforesis bidimensional	25
5. Determinación de carbohidratos por el método de fenol-sulfúrico en geles de poliacrilamida	25
6. Cromatografía de exclusión molecular	25
7. Análisis inmunoenzimático (ELISA)	33
DISCUSION	42
BIBLIOGRAFIA	46

INTRODUCCION

DEFINICIÓN.

La amibiasis es una infección del hombre provocada por *Entamoeba histolytica*. Esta especie usualmente vive como comensal en el lumen del intestino grueso, pero puede invadir la mucosa intestinal produciendo la disentería o el ameboma. Si el parásito llega al torrente circulatorio, puede producir lesiones extraintestinales, siendo el hígado el órgano más afectado y en el cual llega a producir el absceso hepático amibiano (AHA).

ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

El parásito fue demostrado por Lesh en 1875 en un paciente en la ciudad de Arcangel (cercano al Círculo Ártico) Rusia. Este individuo sufría de disentería crónica asociada a la presencia de amibas en sus heces. Aún cuando las amibas provenientes de sus heces produjeron disentería cuando se inocularon a perros, Lesh no creyó que el parásito fuera el agente causal.

La patogenidad de la amiba fue demostrada por varios investigadores: Kartulis (1887) trabajando en Egipto, describió la existencia de lesiones hepáticas amibianas. En 1891, Councilman y Lafleur hicieron descripciones clínicas y patológicas detalladas de disentería amibiana y AHA, Walker y Sellars (1913) (1) demostraron que *Entamoeba coli* era comensal o saprófita mientras que *Entamoeba histolytica* era patógena.

Entamoeba histolytica

Pertenece al phylum Sarcodina (se mueve por pseudópodos y tiene una reproducción asexual por fisión binaria, clase Rhizopoda (se enquista y habita el colon intestinal) y al género Entamoeba (el trofozoito tiene un núcleo con un pequeño cariosoma central y una membrana nuclear con gránulos de cromatina adyacentes).

LA ENFERMEDAD

La amibiasis tiene una distribución cosmopolita y su incidencia difiere de una área a otra. Se estima que la enfermedad afecta a 5% de la población mundial, siendo ésta más alta en las regiones tropicales y subtropicales. En México la amibiasis es una enfermedad endémica.

El ciclo de vida de *E. histolytica* es relativamente simple ya que no existen aparentemente estadios sexuales ni se conocen huéspedes intermediarios. En la forma vegetativa, el trofozoito se aloja en el intestino y se reproduce por fisión binaria. Bajo condiciones que se desconocen, los trofozoitos se diferencian en quistes (fase infectiva) los cuales se excretan y pueden infectar a nuevos huéspedes por vía oral (fig. 1).

La patogenia de la amibiasis está dada por la colonización del intestino por una cepa virulenta seguida de la adherencia a la mucosa intestinal, con destrucción de las barreras intestinales a través de enzimas y productos tóxicos. Esto, ocasiona la lisis de células intestinales, lo cual lleva a la interrupción de la mucosa intestinal con la aparición de úlceras del colon. Lo anterior conlleva a su vez a una destrucción de tejidos más pro-

ENTAMOEBA HISTOLYTICA

CICLO DE VIDA

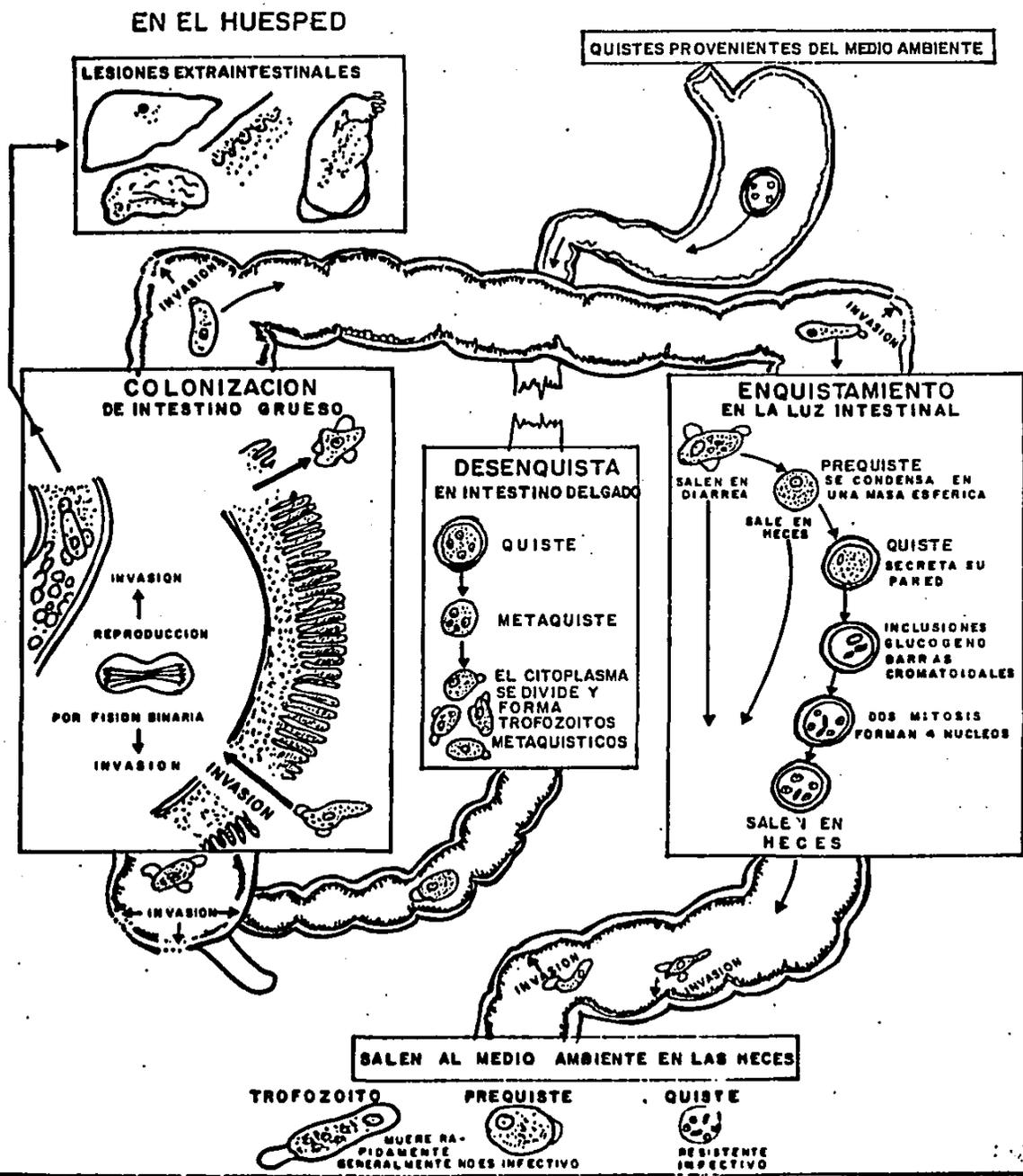


FIG. 1 - CICLO DE VIDA DE E. HISTOLYTICA.

fundos con una invasión a órganos más distantes.

Desde el punto de vista clínico la amibiasis puede ser: sintomática o asintomática. La amibiasis sintomática puede clasificarse a su vez en intestinal y extraintestinal:

La amibiasis intestinal puede presentarse principalmente como un cuadro de disentería aguda o crónica, como ameboma o apendicitis.

La amibiasis extraintestinal se localiza principalmente en el hígado (AHA), sin embargo puede existir en otros órganos tales como pulmón, cerebro, etc., así como en la piel.

COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LA MEMBRANA DE LOS TROFOZOITOS DE *E. HISTOLYTICA*.

El entendimiento del complejo fenómeno que ocurre durante las interacciones huésped-parásito en la amibiasis, requiere del conocimiento de la composición química de la membrana del parásito.

Un análisis de lípidos totales de trofozoitos de *E. histolytica* demostró que 60-70% estaba compuesto de fosfolípidos, mientras que el colesterol era componente de la fracción no saponificable (2). La composición de ácidos grasos de *E. histolytica* fue similar a la de *E. invadens* (3), un parásito de réptiles.

Los lípidos de las especies de *Entamoeba* se han estudiado tanto en extractos totales de trofozoitos (4) como en membranas plasmáticas aisladas y fracciones de membrana interna (5). La composición de lípidos de estas membranas varía cualitativa y cuantitativamente de las células de mamíferos, ya que en aquellas los lípidos que contienen etanolamina predominan sobre los que contienen colina. Los extractos plasmáticos amibianos contienen un lípido poco usual, el fosfoetilceramido (CAEP) y la fosfatidil colina que se encuentra en grandes cantidades (3, 4).

Otros fosfolípidos presentes, incluyen ácido fosfatídico, fosfatidil inositol, fosfatidil serina y esfingomiélinea.

La composición de fosfolípidos de la membrana plasmática difiere de las células intactas y de vesículas internas, en que los niveles de fosfatidilcolina son menores en la membrana plasmática y CAEP está incrementada (5).

La composición poco común de los lípidos de membrana de *Entamoeba* en general y de *E. histolytica* en particular, podría estar relacionada a los requerimientos de las amibas tanto para su elasticidad como para su estabilidad (3).

La presencia de aminoetilfosfonato ceramido puede conferir a la amiba ventajas biológicas importantes, pues es resistente a la hidrólisis y se puede resintetizar rápidamente.

El análisis de las proteínas de membrana de *E. histolytica* es difícil, pues los marcadores enzimáticos específicos usados para diferenciar membrana plasmática, de fracciones de membrana interna no están presentes. Además por su actividad proteolítica, la amiba tiende a degradar a los polipéptidos durante su aislamiento.

Mc Laughlin y Meerovitch (4, 6) identificaron 9 polipéptidos distintos en una fracción enriquecida con membranas plasmáticas y encontraron una fosfohidrolasa ácida unida fuertemente a la membrana.

Serrano y cols (7) encontraron actividad de fosfatasa ácida en una fracción de membrana aislada de homogeneizados amibianos, y asumieron que se encontraba tanto en la membrana plasmática como en las vacuolas digestivas de *E. histolytica*.

Este mismo grupo encontró que en geles de poliacrilamida con tinción para proteínas se observaban 8 bandas; cuando estas mismas bandas se trataron de encontrar por medio de la tinción de Schiff-ácido peryódico no se observaron.

Aley y cols (5) obtuvieron fracciones purificadas de membrana plasmática de *E. histolytica* usando concanavalina A. En esas fracciones detectaron al menos 12 proteínas en el intervalo de 12 000 a 200 000 daltones de peso molecular. Algunos de los polipéptidos encontrados fueron glicoproteínas.

La presencia de carbohidratos en la membrana de *E. histolytica* se detectó por medio de citoquímica estructural (8).

Los residuos de manosa y glucosa sobre la superficie celular fueron identificados por la aglutinación de cepas patógenas de *E. histolytica* por concanavalina A e inhibición de la reacción con α -metil manósido (9).

Los receptores de concanavalina A se detectaron al nivel ultraestructural con el uso de la reacción secuenciada de concanavalina A-peroxidasa-benzidina (10) o de concanavalina A marcada con yodo.

El método empleado por Aley y cols (5) para aislar preparaciones enriquecidas de membrana plasmática, permitió tanto el estudio de los componentes antigénicos de la superficie celular como las posibles diferencias químicas y antigénicas entre cepas virulentas y no virulentas.

INMUNOLOGIA DE LA AMIBIASIS.

1. CARACTERIZACIÓN DE ANTIGENOS AMIBIANOS.

La caracterización de los componentes antigénicos de *E. histolytica* ha sido una de las principales herramientas en el estudio del parásito.

En el pasado, la tendencia general fue usar extractos acuosos crudos de antígeno total, pero en el presente se tiende a identificar cualitativa y cuantitativamente a los principales antígenos del parásito. Los intentos iniciales por caracterizar la composición antigénica de *E. histolytica* dieron malos resultados por que las amibas eran cultivadas con bacterias del tracto intestinal del hombre, o en asociación con otros protozoarios (11).

La definición del patrón inmunolectroforético de *E. histolytica*, se facilitó por la disponibilidad de cultivos axénicos (12). Una caracterización preliminar de las propiedades fisicoquímicas de antígenos amibianos, incluyendo el análisis electroforético de fracciones purificadas demostró la heterogeneidad del mosaico antigénico de las amibas (13). Los refinamientos en la identificación de los antígenos, ha incrementado progresivamente la lista de bandas de precipitación dadas por extractos crudos o fraccionados de *E. histolytica* en la presencia de antisueros homólogos. Krupp (14) identificó 14 antígenos de *E. histolytica* que reaccionaban con sueros de pacientes de diferentes localizaciones geográficas. Ella reportó, que los patrones fueron prácticamente similares, con mínimas di-

fracciones de cepas (15).

Chang y cols. (16) por doble inmunoelectroforesis obtuvieron hasta 32 picos de precipitinas de cepas axénicas de *E. histolytica*. Estos estudios han mostrado que diferentes cepas de amiba, tienen un gran número de antígenos en común, particularmente aquellos que inducen una respuesta de anticuerpos en humanos infectados. Recientemente, Sawhney y cols. (17) purificaron parcialmente un antígeno de naturaleza glicoproteica soluble, con propiedades hemaglutinantes y precipitantes similares a las descritas en extractos crudos de amibas.

La detección de antígenos de *E. histolytica* en el suero de pacientes con amibiasis invasiva sería de gran importancia para entender mejor el proceso infeccioso. Este antígeno circulante fue encontrado en algunos pacientes en un estudio preliminar (18). Mahajan y Ganguly (19) usando contrainmunoelectroforesis detectaron antígeno amibiano en el material necrótico de 92% de los casos de AHA estudiados. No se han encontrado complejos inmunes circulantes en pacientes con AHA (20, 21).

Por medio de la prueba de ELISA se han detectado antígenos de *E. histolytica* en heces (22). Este método reveló mayor número de casos positivos que el exámen directo de las heces al microscopio. Sin embargo se necesitó un mayor número de casos para evaluar mejor la sensibilidad y especificidad del método.

2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ANTIGENOS AMIBIANOS.

El antígeno amibiano encontrado en infecciones humanas fue atribuido a una fracción microsomal, proveniente del rompimiento de los organismos (23). Mc Laughlin y Meerovitch (6) apoyaron esto, pues los antígenos mas significativos estaban localizados en el citoplasma, asociados con vesículas y cuyo origen probable eran de naturaleza lisosomal. Recientemente, los antígenos purificados que se han obtenido provienen tanto de fracciones ribosómicas como lisosómicas (24).

Existen evidencias de que los anticuerpos anti-amiba son producidos también contra antígenos de superficie. O'Shea y Feria-Velasco (25) usando inmunofluorescencia y microscopía electrónica, encontraron que las IgG purificadas de sueros de pacientes con amibiasis se unen a la superficie de trofozoítos de *E. histolytica*. Posteriormente se demostró que la unión de anticuerpos humanos a la superficie de trofozoítos de *E. histolytica* inducía la modulación de esas moléculas de superficie (formación de casquetes) (26). Este mismo fenómeno ha sido descrito empleando anticuerpos humanos de clase IGA por Acosta y cols. (27).

3. REACCIONES INMUNES HUMORALES.

La respuesta inmune humoral en amibiasis invasiva humana y experimental se caracteriza por la rápida aparición de anticuerpos específicos circulantes. La contrainmunoelectroforesis y la hemaglutinación indirecta (28, 29, 30) son las pruebas más sensibles y específicas para detectar estos anticuerpos.

La mayoría de los anticuerpos anti-amiba encontrados en el suero de pacientes con AHA pertenecen a la clase de inmunoglobulina G (31, 32); ésta probablemente es de subclase 2, dado que son heterocitotrópicos en ileon de cobayo. Los niveles de IGA

también están elevados, aunque en menor proporción que las IgG (33). Arellano y cols. no encontraron anticuerpos homocitotrópicos (34) sugiriendo esto que no había IgE específica.

Se ha demostrado que el suero inmune y γ -globulina anti-amiba producen lisis del 90% de los trofozoítos de *E. histolytica* (35, 36). Este efecto lítico se suprime por adsorción del suero o γ -globulinas con amibas o con antígeno amibiano crudo (37). El suero inmune neutraliza la virulencia de *E. histolytica* patógena en cultivo (38).

El sistema del complemento está involucrado en la defensa contra *E. histolytica*. El suero humano normal induce lisis hasta de 49% de los trofozoítos, cuando se usa a una dilución de 1:3. La lisis bajo estas condiciones es dependiente de la activación del complemento por la vía alterna (39, 40). Estudios experimentales de AHA en hámster tratados con factor de veneno de cobra (el cual depleta complemento) dieron como resultado una mayor severidad y frecuencia de las lesiones hepáticas, después del reto con amibas virulentas (41).

La identificación de anticuerpos circulantes es de gran importancia para el diagnóstico de amibiasis invasiva, sobre todo para la detección de aquellos casos que presentan manifestaciones clínicas atípicas. En el caso de AHA y otras formas severas de infección por *E. histolytica*, la frecuencia de positividad excede a 95%. Por el contrario, en personas aparentemente sanas y en portadores, la frecuencia de reacciones positivas es menor del 10%. Los anticuerpos específicos (hemaglutininas y precipitinas) permanecen por algunos meses o años después del tratamiento (42, 43). Estos hechos, deberán tomarse en cuenta para la interpretación de los resultados serológicos, ya que una reacción positiva puede significar sólo antecedente de infección y no una amibiasis activa.

4. REACCIONES INMUNES CELULARES.

La respuesta inmune celular en amibiasis se ha estudiado tanto *in vivo* como *in vitro*. En el primer caso se emplearon pruebas que medían la hipersensibilidad tardía, mientras que para el segundo se hizo a través de la determinación de factores mitogénicos para linfocitos y el MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos). Los resultados obtenidos con la intradermoreacción no mostraron correlación con los obtenidos por las pruebas serológicas (31, 44, 45). Esta discrepancia podría deberse tanto a variaciones en el antígeno empleado como a diferencias en el tiempo de evolución de la enfermedad en la cual se realizaron las pruebas.

Con preparaciones antigénicas, obtenidas de cultivo axénico, una gran proporción de pacientes con AHA activo tuvieron una respuesta cutánea negativa (46). Esta prueba fue negativa sólo para el antígeno amibiano, mientras que positiva para estreptoquinasa y estreptodornasa. Estos resultados indicaban inmunosupresión transitoria de naturaleza específica (47).

El número de células T circulantes fue normal en estos mismos pacientes un mes después de la recuperación clínica (47, 48).

La respuesta proliferativa inducida por concanavalina A, en linfocitos de pacientes con AHA, no difirió significativamente de aquella inducida en individuos normales, aún cuando en el grupo

de pacientes se encontró que los valores estaban ligeramente disminuidos (47). Resultados similares fueron reportados por Harris y Bray (49) usando fitohemaglutinina como mitógeno. Por otro lado, en amibiasis experimental en hámster, Gold y cols. (50) encontraron disminuida la respuesta de linfocitos a fitohemaglutinina y concanavalina A.

La prueba de MIF dió resultados similares a los obtenidos con la intradermoreacción en los casos de amibiasis invasora humana (47). Estas fueron negativas durante la fase aguda de la infección y se convirtieron en positivas después del tratamiento. Los anticuerpos específicos estuvieron presentes desde el inicio de la enfermedad en pacientes cuyas reacciones intradérmicas y MIF eran negativas. En la amibiasis experimental mientras que la respuesta inmune celular estuvo deprimida durante las fases iniciales de absceso hepático inducido, la respuesta inmune humoral estuvo presente.

Los resultados anteriores parecen indicar que la respuesta inmune primaria en amibiasis es predominantemente humoral, sin embargo es evidente que la inmunidad mediada por células participa también de alguna manera desde el inicio del proceso infeccioso. Se ha visto que la administración de fármacos inmunosupresores favorece el desarrollo del AHA inducido en hámsters (51). En consecuencia, sólo ratones inmunosuprimidos con suero antilinfocítico desarrollan lesiones hepáticas después de la inoculación intracecal de amibas virulentas (52). Por otro lado, extractos acuosos de *E. histolytica* (53) o una fracción antigénica subcelular compuesta principalmente de membranas lisosomales (54) indujeron transformación blastoide de linfocitos de pacientes con AHA, sugiriendo la sensibilización de linfocitos T a antígenos amibianos.

5. INDUCCIÓN DE INMUNIDAD PROTECTORA.

Antígeno crudo y trofozoitos vivos de *E. histolytica* indujeron inmunidad protectora contra la inoculación intrahepática de amibas virulentas en hámster (55, 56). Se obtuvo también protección parcial (probablemente por inmunidad pasiva) cuando se inoculó a hámsters con suero humano inmune (38). Posteriormente se demostró que fracciones lisosomales y ribosomales aisladas de *E. histolytica* indujeron inmunidad protectora contra inoculación intrahepática de amibas virulentas en hámsters. Estas fracciones purificadas, tuvieron propiedades antigénicas más potentes *in vitro* e *in vivo* que el antígeno crudo utilizado previamente (57).

Los resultados antes mencionados, se corroboraron en hámsters adultos los cuales fueron protegidos contra reto intrahepático de amibas después de la inyección intradérmica de trofozoitos vivos (58). La inmunidad protectora se obtuvo en cobayos con una fracción antigénica de alto peso molecular, aislada de *E. histolytica*. Estos animales no desarrollaron lesiones hepáticas después de la inoculación directa de amibas virulentas (59, 60).

OBJETIVO.

El estudio de la respuesta inmune en contra de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* es difícil de llevar a cabo debido a la diversidad de componentes antigénicos que presenta.

En infecciones naturales y experimentales, los antígenos de superficie juegan un papel importante ya que son los primeros que tienen contacto directo con el hospedero. Se ha descrito previamente un antígeno de naturaleza polisacarídica que reacciona tanto con el suero de pacientes con amibiasis como con el suero de conejos inmunizados con trofozoitos de *E. histolytica* (51, 52).

El objetivo de este trabajo es estudiar el comportamiento inmunoquímico del antígeno polisacarídico de *E. histolytica* obtenido por dos métodos.

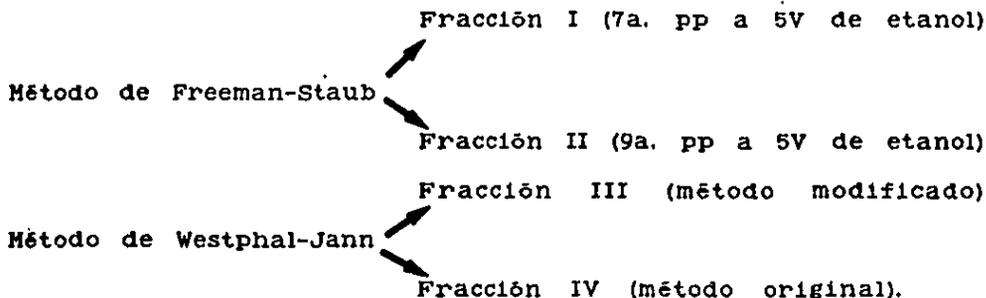
MATERIAL Y METODOS.

1. CEPA AMIBIANA.

Se utilizó la cepa HM-1 IMSS de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cultivados en medio axénico TYI-S-33 de acuerdo a la técnica descrita por Diamond (63).

2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ANTIGENOS POLISACARIDICOS.

Los antígenos de naturaleza polisacarídica se extrajeron por los métodos que se mencionan a continuación:



2.1. MÉTODO DE FREEMAN-STAUH.

Para obtener un polisacárido puro, es necesario hidrolizar el complejo de células secas con ácido acético 0.1 N. Este procedimiento fué usado por primera vez por White (64) y modificado posteriormente por Freeman (65) y Staub (66).

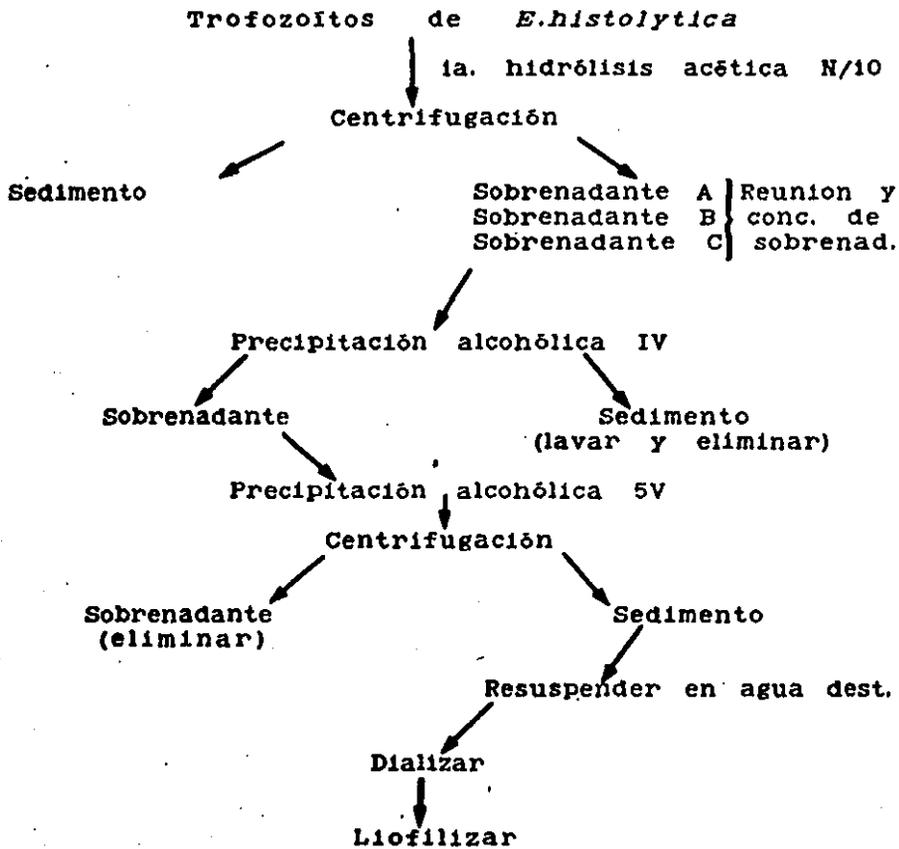
Procedimiento:

Un lote de 5.4 g de peso seco de trofozoítos de *E. histolytica* se resuspendieron en 90 ml de agua destilada calentada a 90° C; a éstos se adicionaron 10 ml de ácido acético 1 N previamente calentado a 90° C. La muestra se incubó durante 90 min. a 90° C. Posteriormente la muestra fué enfriada al chorro de agua y centrifugada a 2000 xg durante 60 min. Se guardó el sobrenadante y al precipitado se le realizaron 2 extracciones acéticas más. Los sobrenadantes resultantes dieron un volumen de aproximadamente 225 ml y con este producto se procedió a la extracción del polisacárido (figura 2).

2.2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR FENOL-AGUA [WESTPHAL-JANN].

El fenol se conoce como un excelente solvente para muchas proteínas. El coeficiente de partición de mezclas bifásicas de fenol y agua permite la extracción de proteínas en solución acuosa bajo condiciones controladas de pH y fuerza iónica en un solo paso de reacción. En contraste, los polisacáridos son generalmente solubles en agua pero insolubles en fenol por lo que pueden precipitarse de la solución acuosa, por adición de fenol líquido. El fenol es un ácido débil, la constante de disociación a 16-19° C en agua, es 1.1-1.2 x 10⁻¹⁰. Las mezclas de fenol y agua tienen una constante dieléctrica alta. Estos hechos forman

**FIG 2. EXTRACCION DEL ANTIGENO POLISACARIDICO
POR EL METODO DE FREEMAN-STAUER.**



la base de un método de partición de proteínas y polisacáridos y/o ácidos nucleicos entre fenol y agua.

Procedimiento: Se resuspendieron en 100 ml de agua destilada a 90° C, 5 g de trofozoitos de *E. histolytica* (67) liofilizados; se les añadieron 100 ml de fenol al 90% igualmente calentado. Esto se hizo con agitación vigorosa y se colocó en el baño maría a 65-68° C por 15 min. Una vez terminado el tiempo de extracción, la suspensión se enfrió a 10° C en baño de hielo y se centrifugó a 1000 xg por 30-45 min. Por el efecto de la centrifugación se formaron 4 capas, una acuosa, una fenólica, un residuo insoluble y una capa en la interfase fenol-agua. La fase acuosa se separó y la fenólica y la insoluble se volvieron a tratar de la misma forma.

Los extractos crudos combinados de las fases acuosas se dializaron por varios días contra agua destilada para eliminar el fenol.

El producto final se obtuvo después de varias ultracentrifugaciones (figura 3).

2.3. MÉTODO FENOL-AGUA MODIFICADO [62].

Los trofozoitos fueron lavados tres veces en solución reguladora de fosfatos salina (PBS, 145 mM NaCl, regulador de fosfatos 10 mM, pH 7.2), posteriormente se sometieron a ruptura por congelamiento-descongelamiento y después se sometieron a ultracentrifugación a 100 000 x g durante 2 h. Tanto la pastilla como el sobrenadante que se obtuvieron de la ultracentrifugación fueron resuspendidos en agua destilada y se les hizo una extracción con fenol de acuerdo al método original de Westphal-Jann. Las fases acuosas así obtenidas tanto de la pastilla como del sobrenadante, fueron dializadas exhaustivamente contra agua destilada para eliminar los residuos de fenol y posteriormente someterlas a una nueva ultracentrifugación a 100 000 xg durante 2 h. Las fracciones así obtenidas fueron liofilizadas y mantenidas a 20° C hasta su uso (figura 4).

La fracción PA-S se seleccionó por la respuesta inmune que mostraron los sueros de los pacientes con AHA por hemaglutinación indirecta a este antígeno y por presentar muy baja contaminación por glucógeno.

2.4. EXTRACCIÓN DEL ANTIGENO CRUDO DE TROFOZOITOS DE *E. HISTOLYTICA*.

Los trofozoitos de *E. histolytica* obtenidos de un cultivo axénico, se lavaron tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS pH 7.2) y se sometieron a homogenización para romper las células; este producto se sometió posteriormente a centrifugación a 33 000 xg durante 30 min y el sobrenadante obtenido se utilizó como antígeno crudo (figura 5).

3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS.

3.1. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES NEUTROS.

La determinación de azúcares se llevó a cabo por el método de fenol-sulfúrico de Dubois y cols (68).

La curva de referencia se hizo con glucosa a las concentra-

FIG. 3 EXTRACCION DEL ANTIGENO POLISACARIDICO POR EL METODO DE WESTPHAL ORIGINAL.

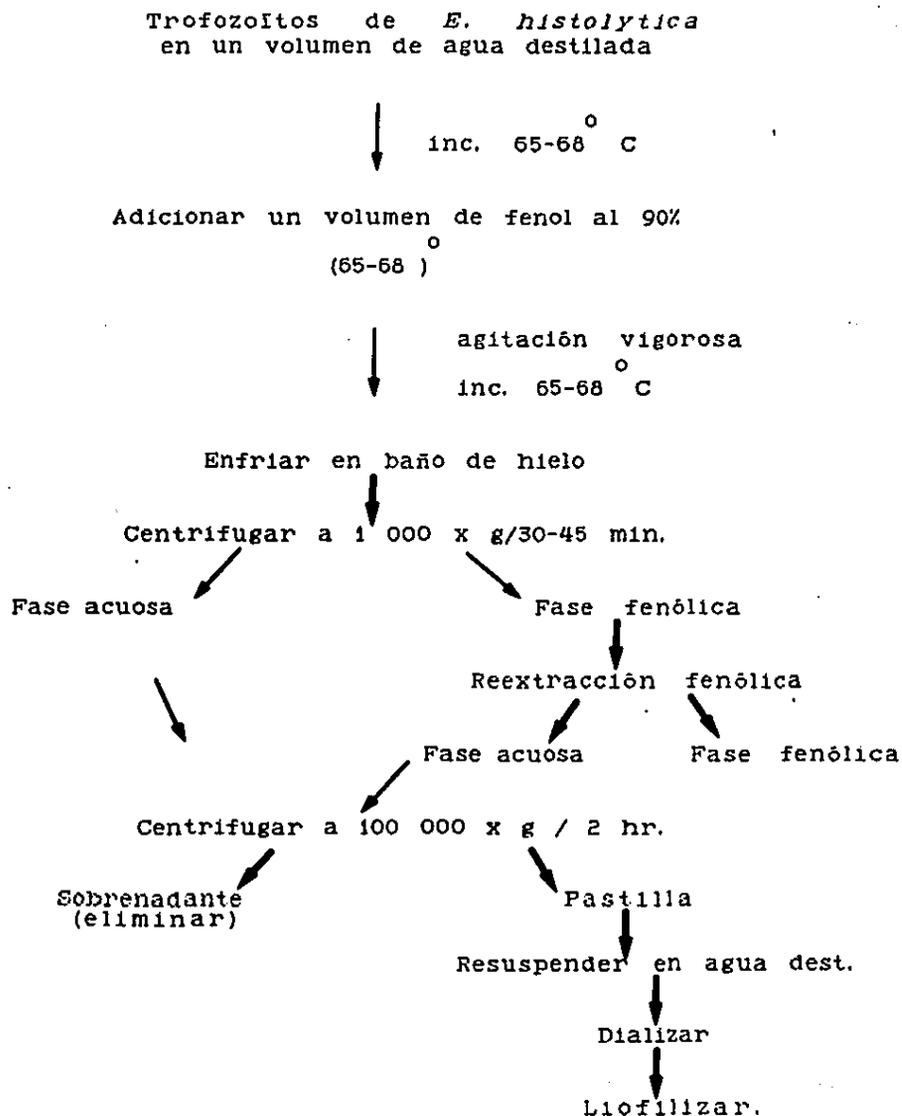


FIG.4. EXTRACCION DEL ANTIGENO POLISACARIDICO POR EL METODO DE WESTPHAL MODIFICADO

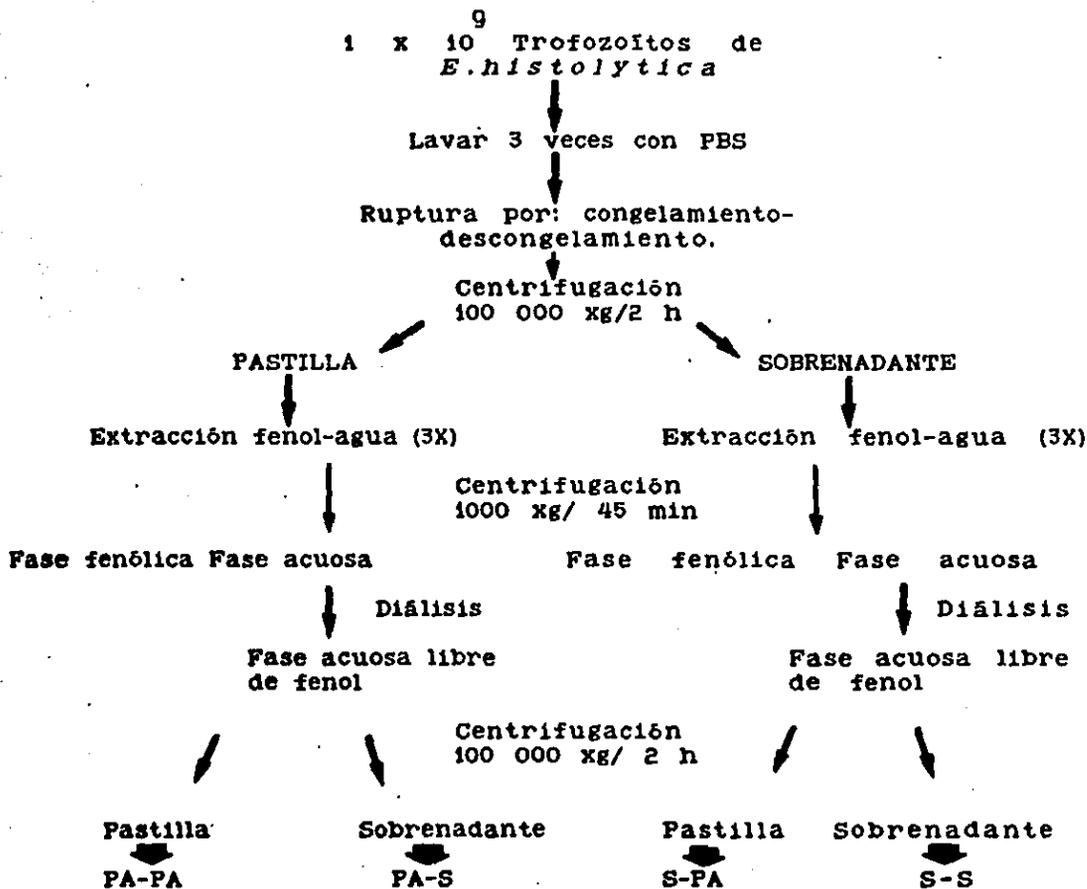
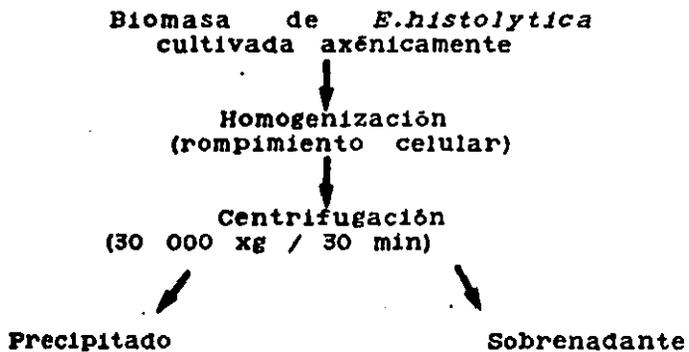


FIG. 5. EXTRACCION DEL ANTIGENO CRUDO DE TROFOZOITOS DE *E.HISTOLYTICA*.



ciones de 5, 10, 15 y 20 μg . A un volumen dado de las diferentes concentraciones de glucosa y problemas se le agregó el mismo volumen de fenol al 5% y 5 volúmenes de H_2SO_4 concentrado. Todo lo anterior se incubó por 10 min a 80°C y el producto final se leyó a 490 nm.

3.2. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES AMINADAS.

Estos compuestos se determinaron de acuerdo a la técnica de Morgan y Rondle (69). La curva de referencia se realizó con glucosamina a las concentraciones de 5, 10, 15 y 20 μg .

Se hidrolizaron 75 μl del problema (10 mg/ml) con 75 μl de HCl 8N por 6 h a 100°C . El producto hidrolizado se centrifugó y al sobrenadante se le agregaron 150 μl de agua destilada, 200 μl de Na_2CO_3 2M y 250 μl de acetil-acetona. Lo anterior se incubó por 20 min a 100°C .

Después se le adicionaron 250 μl de etanol y 500 μl de p-dimetilaminobenzaldehído, con agitación para eliminar el CO_2 y el producto resultante se leyó a 530 nm.

3.3. DETERMINACIÓN DE FOSFATOS.

Para la determinación de fosfatos en compuestos orgánicos se utilizó el método de Macheboeuf y Delsal (70) modificado por Chen y cols (71).

La curva de referencia se realizó con KH_2PO_4 . A 200 μl de la muestra (10 mg/ml) se le agregó 25 μl de H_2SO_4 36 N. Lo anterior se incubó por 90 min a 170°C . Para decolorar la muestra se le agregó 5 μl de H_2O a 30% y se calentó a 150°C por 10 min. Se neutralizó por la adición de 500 μl NaOH 1.0 N y después se le agregó 500 μl de un reactivo específico constituido por: 2 V de H_2O , 1 V de H_2SO_4 6N, 1 V de molibdato de amonio al 2.5% y 1 V de ácido ascórbico al 10%. Finalmente, la solución se incubó a 37°C durante 90 min. y se leyó a 780 nm.

3.4. DETERMINACIÓN DE PROTEINAS.

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry y cols. (72) con el reactivo de Folin y Ciocalteau.

4. TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS.

4.1. DOBLE INMUNODIFUSIÓN [73].

La característica esencial de una prueba de doble difusión es que tanto el anticuerpo como el antígeno deben migrar hacia una área común de reacción antes de que se inicie la precipitación entre uno y otro, por lo tanto, si los dos reactantes son empleados en desproporción serológica, cualquier prueba de doble difusión parecerá una prueba de difusión simple. Normalmente el balance entre los dos reactantes al inicio no es exacta, pero diferencias moderadas comúnmente encontradas se compensan poco después de que el antígeno y el anticuerpo se encuentran.

Para la prueba se utilizó agarosa a 1% (en solución salina isotónica) sobre una placa de vidrio. El antígeno se colocó en los pozos a una concentración de 1 mg/ml (20 μl) y el anticuerpo empleado para la reacción fue suero de conejo anti-LPFG y 20 sueros de pacientes con diagnóstico de AHA. La placa así prepa--

rada se metió a una cámara húmeda por 24 h, al término del cual se procedió a su lavado, secado y teñido con azul de Coomassie brillante.

4.2. TÉCNICA DE COMETES DE LAURELL [74].

Este sistema inmunolectroforético se lleva a cabo en geles de agarosa que contienen un antisuero monoespecífico con un antígeno poliespecífico o un antisuero poliespecífico con un antígeno monoespecífico. La identificación del antígeno se da por un precipitado en forma de cohete y la cuantificación puede basarse en la medición de la altura del precipitado.

Procedimiento:

En una placa de vidrio de 100 x 100 x 1.5 mm se colocó la solución de agarosa a 1% en solución amortiguadora de barbital pH 8.6 a 56° C mezclada con 200 μ l de suero anti-LPFG o con 200 μ l de suero de pacientes con absceso hepático amibiano. Posteriormente se hicieron 4 pozos en el gel con el fin de colocar las fracciones a estudiar. La placa se colocó en una cámara de electroforesis para permitir la migración del antígeno sobre el gel. (figura 6).

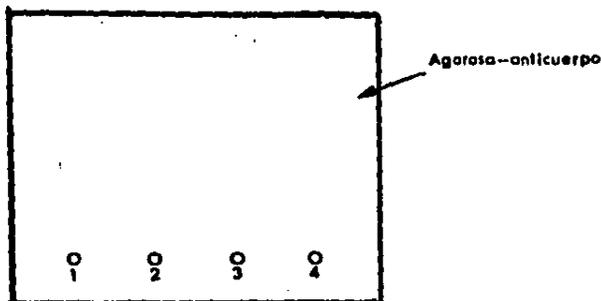


Figura 6. Técnica de cohetes de Laurell.

El corrimiento se realizó a 10 V/cm durante 3 h y posteriormente la placa se lavó, se secó y se tiñó con Azul de Coomassie brillante.

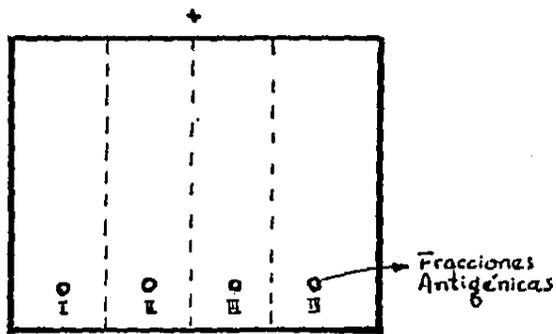
4.3. INMUNOELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL [75].

La combinación de separación electroforética de proteínas en gel de agarosa seguida por electroforesis perpendicular a ésta en un gel conteniendo anticuerpo hace que la inmunolectroforesis bidimensional o cruzada sea superior a la técnica inmunolectroforética clásica. El área encerrada por un precipitado individual es proporcional a la concentración antígeno-anticuerpo del sistema. La cuantificación se basa por lo tanto en el método de planimetría.

Procedimiento (figura 7):

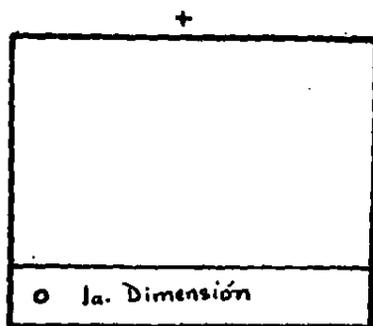
1. 15 ml de la solución de agarosa a 1% calentada a 56° C se

a). 1a. Dimensión



Corrimiento: 8-10 V/cm durante 90 min.

b). 2a. Dimensión



Corrimiento: 1-2 V/cm durante 16-20 h.

FIG. 7. INMUNOELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.

depositan en una placa de vidrio de 90 x 110 x 1.5 mm.

2. Después de la solidificación de la agarosa se hicieron cuatro pozos con el horador .

3. Las muestras de 4 μ l (1 mg/ml) se aplicaron con una micropipeta.

4. La placa de vidrio con el gel se colocó en la cámara de electroforesis y el gel se conectó con el amortiguador que se encontraba en los reservorios por medio de puentes de papel.

5. La electroforesis en la primera dimensión se llevó a cabo a 8-10 V/cm durante 90 min a 4° C.

6. El gel se cortó de manera horizontal a los corrimientos observados y cada gel fué transferido a otra placa de vidrio.

7. En esta placa se colocaron 12 ml de agarosa conteniendo 200 μ l del suero de los pacientes con AHA se depositan en la parte sobrante de la placa (una placa para cada paciente con AHA).

8. Después de 5 a 10 min la placa de vidrio con el gel solidificado se colocó de nuevo en la cámara de electroforesis y el gel se conectó al amortiguador por medio de puentes de papel.

9. La electroforesis en la segunda dimensión se llevó a cabo con 1-2 V/cm a 10-20° C durante toda la noche (16-20 h).

10. Después de la electroforesis el gel fue lavado, secado y teñido con Azul de Coomassie Brillante.

4.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LAS DIFERENTES FRACCIONES POLISACARIDICAS.

Una característica importante de los geles de poliacrilamida es la facilidad con que el tamaño efectivo de sus poros puede variarse con tan sólo cambiar el contenido total del monómero y su grado de entrecruzamiento; esta situación ha permitido el estudio riguroso de sus propiedades fisicoquímicas como filtrador molecular y el tratamiento teórico de la migración de las moléculas en este soporte (76, 77). Las separaciones pueden ser efectuadas en base sólo al peso molecular, por lo cual se emplea SDS para evitar las diferencias individuales de las proteínas (78, 79). A los geles se les pueden incorporar sustancias disociantes como la urea y SDS sin que se vean afectados.

También pueden emplearse agentes reductores como 2-mercaptoetanol o ditiotreitól para romper los puentes disulfuro de las proteínas. Los dos principales usos que se le dan a la electroforesis discontinua son la determinación de la pureza de proteínas y el análisis de los componentes de una mezcla.

Procedimiento:

Gel de poliacrilamida a 15% con urea 8 N. Las fracciones por analizar se trataron de la siguiente manera: SDS, sacarosa, 2-mercaptoetanol, tris-HCl pH 6.8 y azul de Bromofenol. Se analizaron 10 μ g de cada fracción las cuales se calentaron a ebullición durante 5 min. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 20 mA/gel.

Después del corrimiento, el gel se cortó por carril y cada carril se cortó a su vez en trozos de 3 mm cada uno. Estos se colocaron en un tubo de ensaye que contenía 0.5 ml de agua desti-

lada y se dejaron levigar toda la noche. Posteriormente se determinó la concentración de carbohidratos por el método de fenol-sulfúrico (68).

4.5. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.

Este tipo de cromatografía también se conoce con el nombre de filtración en gel o cromatografía de separación molecular. La técnica consiste en separar una muestra a través de una columna empacada con un material inerte, altamente hidratado. El soporte sólido está constituido por innumerables partículas redondeadas que son polímeros de carbohidratos o de acrilamida con diferentes grados de entrecruzamiento (sephadex, Bio-Gel, agarosa, etc).

Los poros de las partículas permiten a las moléculas pequeñas quedar adsorbidas en la matriz sólida mientras que las moléculas grandes siguen el flujo del líquido no estacionario. Esto es como si las moléculas grandes pasaran entre las partículas de la matriz, es decir, como si fueran excluidas de la parte sólida. De ahí deriva el término volumen excluido que corresponde al volumen acuoso fuera de las partículas.

El Bio-gel A es una serie completa de geles de agarosa distinguida por su excepcionalmente alto poder resolutivo sobre un vasto intervalo de pesos moleculares. El intervalo de fraccionamiento de Bio-gel A 5M es de 1×10^4 a 5×10^6 dalton y Bio-gel A 150M es de 1×10^6 a 1.5×10^8 .

Procedimiento:

Para estudiar el perfil de levigación de los polisacáridos derivados de *E. histolytica* se decidió marcar cada una de las 4 fracciones obtenidas con borohidruro de sodio tritiado el cual reduce a la molécula polisacáridica transformando los grupos carboxilo o aldehído en grupos alcohol con el consiguiente marcaje de la molécula.

Marcaje de las fracciones polisacáridicas con NaBH_4 (^3H).

Para cada fracción se utilizaron 50 μl a una concentración de 10 mg/ml. A lo anterior se le agrego 150 μl de agua destilada y una mezcla de 50 μl de NaBH_4 (^3H) (16.67 μM) (2.5 mCi) y 250 μl de NaBH_4 frío (1 mg/ml). La mezcla se deja en reposo toda la noche a 25°C o 6 h a 4°C . La reacción se detuvo agregando ácido acético hasta pH 4 para las diferentes fracciones las cuales se dializaron por separado para eliminar todo el NaBH_4 marcado libre, finalmente, las muestras se liofilizaron.

Los productos liofilizados se resuspendieron en 200 μl de agua destilada y una alícuota de 2 μl de cada fracción mas 1 ml del líquido de centelleo fue leída en un contador beta.

Se utilizaron columnas para cromatografía poly-prep de 0.8 X 4 cm cuyo volumen es de 2 ml de medio cromatográfico con un reservorio integral de 10 ml.

Del material radiactivo obtenido se pasaron 20 μl de cada fracción a través de una columna de Bio-gel A 5M equilibrada con agua, es decir, se utilizó una columna para cada una de las cuatro fracciones a estudiar. Se obtuvieron fracciones de 50 μl aproximadamente; de éstas, se tomaron a su vez 25 μl para la determinación de carbohidratos por el método de fenol-sulfúrico.

Del cromatograma obtenido de la fracción III se tomó el pico 1 que consistió de las fracciones 15 a 25 y de nuevo se pasaron a

través de una columna de Bio-gel A 150M. Se tomaron alícuotas de 2 μ l para poder determinar su radiactividad.

El pico 1 de la fracción III también se trató con una solución amortiguadora de boratos salina adicionada con SDS al 1%, se pasó a través de una columna de Bio-gel A 5M equilibrada con el mismo amortiguador adicionado de SDS; de las fracciones obtenidas de esta filtración se tomaron 4 μ l para la determinación de radiactividad.

4.6. ANÁLISIS INMUNOENZIMÁTICO {ELISA}

Los inmunoensayos enzimáticos están basados en el principio de que un anticuerpo está unido covalentemente con una enzima. En estas condiciones, el anticuerpo retiene tanto la función inmunológica como la función enzimática. El conjugado enzima-anticuerpo puede estar unido a un antígeno y esta unión puede ser revelada por la interacción del sustrato con la enzima a través de una reacción colorida.

Para el trabajo se estudiaron por ELISA 100 sueros de pacientes con absceso hepático amibiano y 100 sueros de individuos normales.

Procedimiento:

1. Recubrir con el antígeno a 4° C toda la noche.



2. Lavar con PBS-Tween 0.1%
3. Bloquear con PBS-gelatina al 0.5% durante 1 h.
4. Lavar con PBS-Tween a 0.1%.
5. Incubar con el primer anticuerpo (suero de pacientes con AHA cuyo título por hemaglutinación fue de más de 1:500 000) por 3 h a 37° C.
6. Lavar con PBS-Tween a 0.1%.
7. Incubar con el segundo anticuerpo anti-Ig humana unida a peroxidasa por 90 min a 37° C.



8. Lavar con PBS-Tween a 0.1%.
9. Agregar el sustrato (o-fenilendiamina, H₂O₂).
10. Leer a 490 nm.

Para optimizar el método se usaron las concentraciones del antígeno de 1 a 10 μ g/ml; diluciones del primer anticuerpo de 1:100, 1:400, 1:1600 y 1:6400 y del segundo anticuerpo de 1:500, 1:1000 y 1:2000.

RESULTADOS.

La composición química se muestra en la tabla I. En ella se puede observar que el antígeno polisacárido obtenido por el método de Freeman-Staub (fracciones I y II) es más pobre en carbohidratos que el obtenido por el método de Westphal-Jann; sobre todo la fracción III que se obtuvo por el método modificado por Isibasi y cols. (62) y en el cual se encuentra la concentración más alta de polisacárido. Por otro lado, se reportó la presencia de hexosaminas sólo en la fracción IV. El contenido de fosfato orgánico varía en las 4 fracciones desde 0.45 hasta 1.58%. Estas concentraciones son proporcionalmente altas en relación a otras moléculas fosfatadas. La porción peptídica medida a través de Lowry demostró que las mayores concentraciones de la misma se encontraban en las fracciones I y IV. Por los resultados obtenidos del estudio químico, podemos señalar que la fracción III es la más pura en relación a su cantidad de polisacáridos, pues alcanza hasta el 93%, además contiene la mínima cantidad de proteínas.

TABLA I. COMPOSICION QUIMICA DE LAS 4 FRACCIONES

DETERMINACION		I	II	III	IV
AZUCARES	NEUTROS	59-62 %	48-50 %	85-93 %	80-85 %
HEXOSAMINAS		0	0	0	10 %
FOSFATOS		0.72-0.84%	0.45-0.68%	1.22-1.58%	0.64%
PROTEINAS		5-6%	3.4-3.88%	1.3-1.9%	4.4-4.9%

2. DOBLE INMUNODIFUSION.

Los resultados encontrados por el método de Ouchterlony indican que los sueros de pacientes con absceso hepático amibiano reconocen los 4 antígenos. Para el estudio de estos experimentos se tomaron como problemas los sueros provenientes de 20 pacientes con diagnóstico de AHA.

De los 20 sueros de pacientes con AHA utilizados en este estudio, 4 dieron respuesta hacia la fracción I; 3 a la fracción II, 7 a la fracción III y 6 a la fracción IV. Además se utilizó un suero anti-LPFG obtenido en conejo y éste fue reconocido por las fracciones III y IV.

3. METODO DE COHETES DE LAURELL.

Por este sistema se observó una mayor resolución, ya que el suero de conejo anti-LPFG reconoció tanto a la fracción I como a la III y IV.

Por este método, de los 20 sueros de pacientes con AHA estudiados, 5 dieron respuesta inmune hacia la fracción I; 4 hacia la fracción II, 6 hacia la fracción III y 5 hacia la fracción IV (figs. 8, 9, y 10). Estos resultados muestran también una

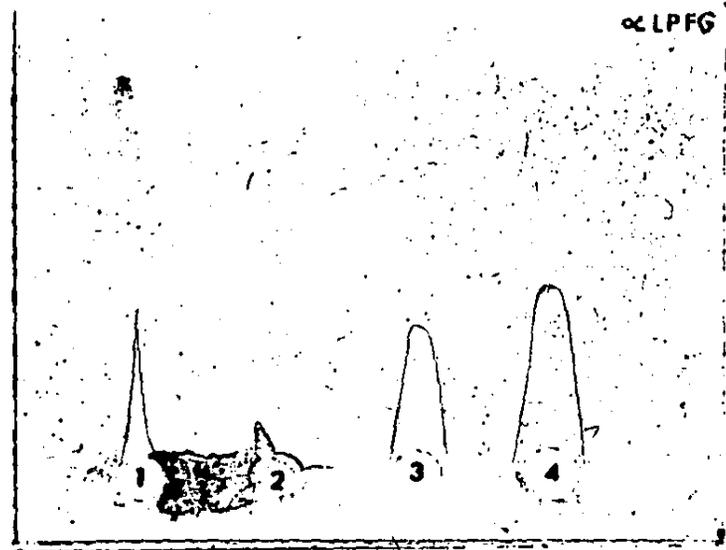


FIG. 8 RESPUESTA HUMORAL DE UN SUERO ANTI-LPFG HACIA LAS 4 FRACCIONES POLISACARIDICAS OBTENIDAS.

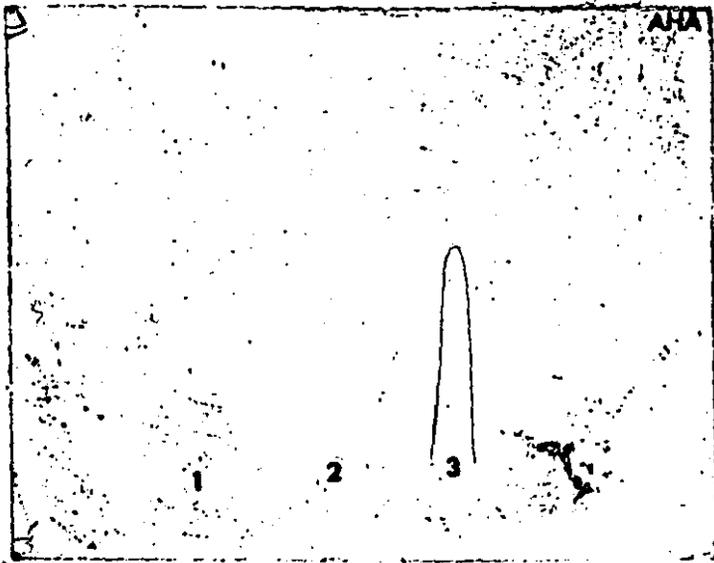


FIG. 9 RESPUESTA HUMORAL DE UN SUERO DE PACIENTE CON AHA HACIA LAS 4 FRACCIONES POLISACARIDICAS.

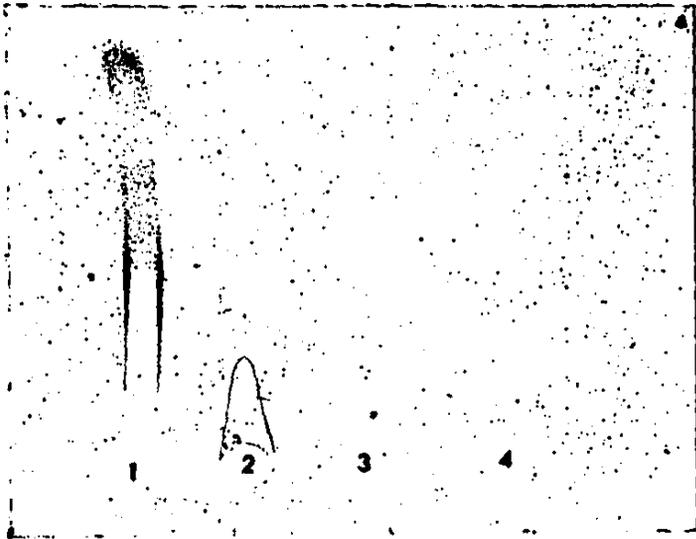


FIG. 10 RESPUESTA HUMORAL DE UN SUERO DE PACIENTE CON AHA HACIA LAS 4 FRACCIONES POLISACARIDICAS.

respuesta inmune heterogénea de los sueros hacia los 4 antígenos.

4. INMUNOELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.

Los resultados obtenidos con este método indican que tanto el suero de conejo anti-amiba (figura 11) como los sueros de los pacientes con AHA (figura 12) dan una banda de precipitación característica de la fracción III. De las otras fracciones estudiadas, la I dió una banda de precipitación que no corresponde a las características de este método, ya que la precipitación se observó en la zona del antígeno y no en la del anticuerpo. Por otro lado, esta banda sólo fue reconocida por un suero de conejo anti-amiba y no fué reconocida por ninguno de los sueros de los pacientes con AHA estudiados (fig. 13).

5. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR EL MÉTODO DE FENOL-SULFÚRICO EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Debido a que no fue posible obtener un patrón de corrimiento electroforético característico de las 4 fracciones cuando se trató de revelarlas con la técnica de nitrato de plata específica de carbohidratos, se decidió determinar la presencia de los polisacáridos en estos geles por el método de fenol-sulfúrico.

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos del corrimiento tanto de la fracción I como de la II; sólo muestra un pico entre las fracciones 46-49. Sin embargo, ambas fracciones no penetran en el gel. Estos resultados podrían indicar que las fracciones estudiadas se encuentran agregadas.

En la figura 15 se observa que las fracciones III y IV tienen una mayor resolución ya que una parte de polisacáridos penetran en los geles de poliacrilamida, sin embargo, la mayor concentración de los mismos continúa en la parte superior. Estos resultados también sugieren agregación de la molécula pero en menor grado que las dos primeras fracciones.

B. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.

En las figuras 16 a 19 se muestran los resultados que se obtuvieron tanto por la determinación de radiactividad (cpm) como por la de carbohidratos de las 4 fracciones estudiadas.

En la figura 16 se observa el perfil de levigación de la fracción I. En ella se encuentra que la concentración de carbohidratos de la fracción es baja y que sale en el volumen de exclusión. En el segundo pico se observa que es positivo para material radiactivo y negativo a la prueba específica para azúcares. Esto puede ser debido a borohidruro de sodio tritado libre o que en algunas moléculas lipídicas agregadas al polisacárido, el grupo carboxilo de sus ácidos grasos se haya reducido y marcado con tritio.

En la figura 17, el perfil de levigación de la fracción II muestra que aún cuando la concentración de carbohidratos medida por fenol-sulfúrico es baja, corresponde a la encontrada con lo marcado por tritio. Esta fracción se separa en dos picos; el primero que sale en el volumen de exclusión y el segundo en el volumen incluido. Estos resultados pueden indicar que además de la molécula principal hay pedazos más pequeños provenientes de la hidrólisis parcial de la misma.

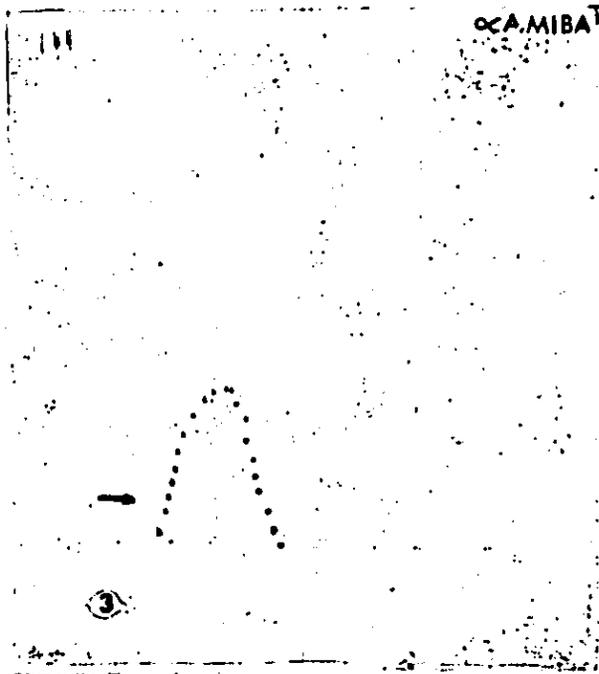


FIG. 11 INMUNOELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE LA FRACCION III CONTRA UN SUERO ANTI-AMIBA OBTENIDO EN CONEJO.

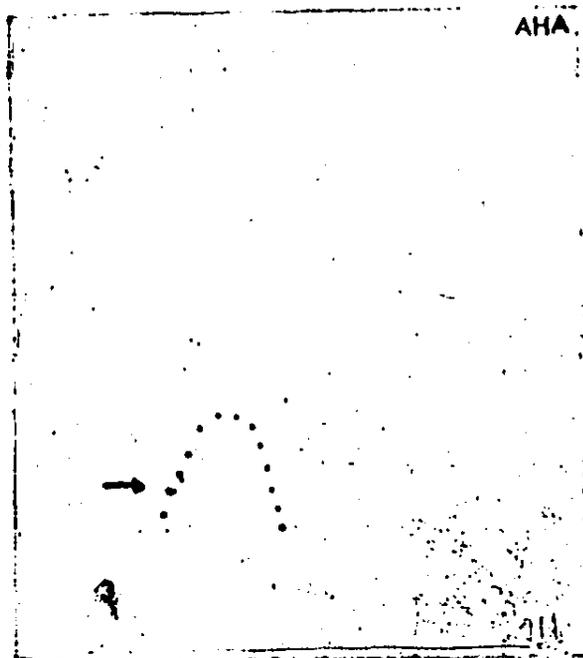


FIG. 12 RESPUESTA HUMORAL DE UN PACIENTE CON AHA HACIA LA FRACCION III OBTENIDA POR EL METODO DE WESTPHAL-JANN MODIFICADO POR ISIBASI.

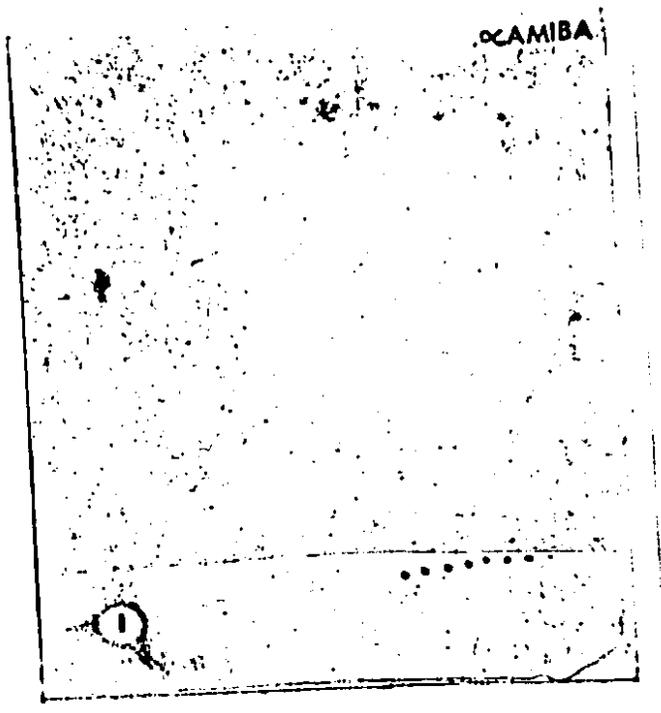


FIG. 13 RESPUESTA HUMORAL DE UN PACIENTE CON AHA HACIA LA FRACCION I OBTENIDA POR EL METODO DE FREEMAN-STAUER.

CORRIMIENTO EN ACRILAMIDA

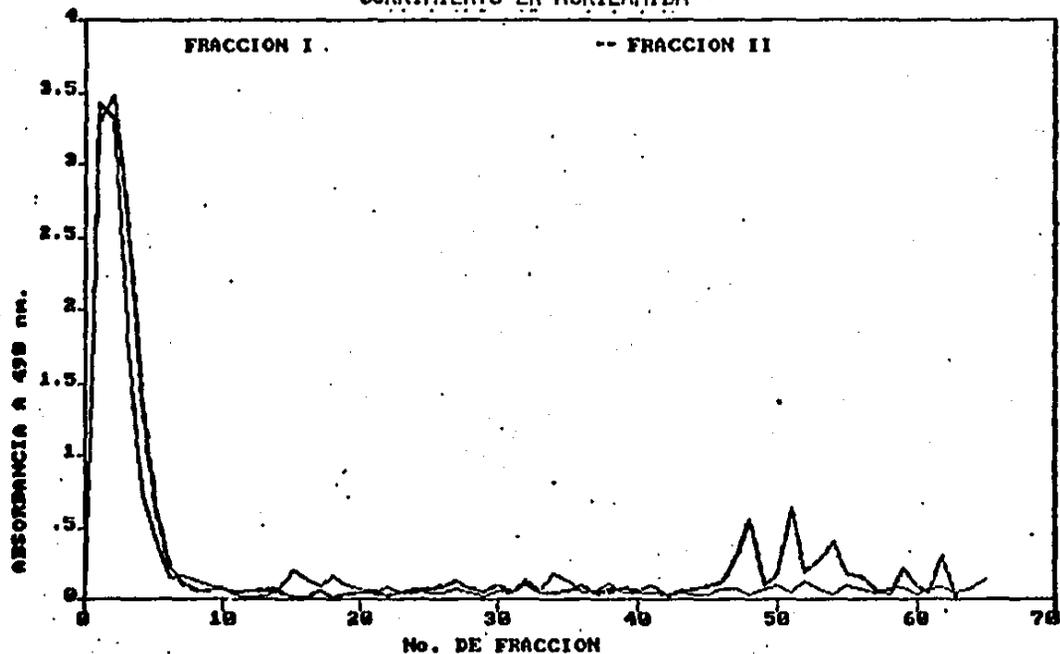


FIG. 14 DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS POR FENOL-SULFURICO DE LAS FRACCIONES I Y II EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

CORRIMIENTO EN ACRILAMIDA --

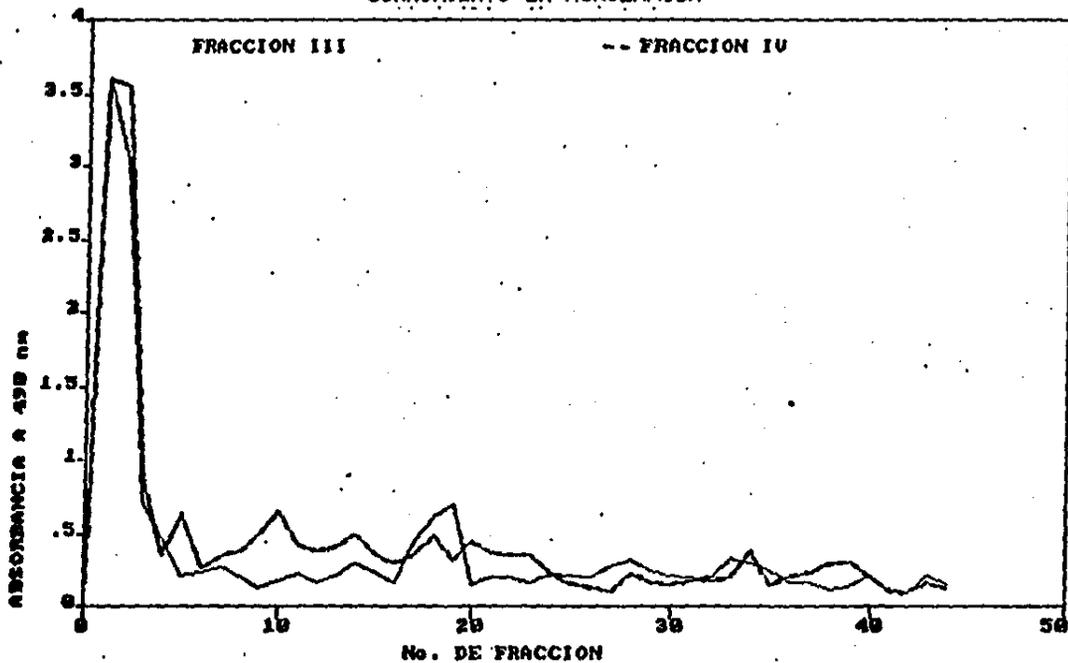


FIG. 15. DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS POR FENOL-SULFURICO DE LAS FRACCIONES III Y IV EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

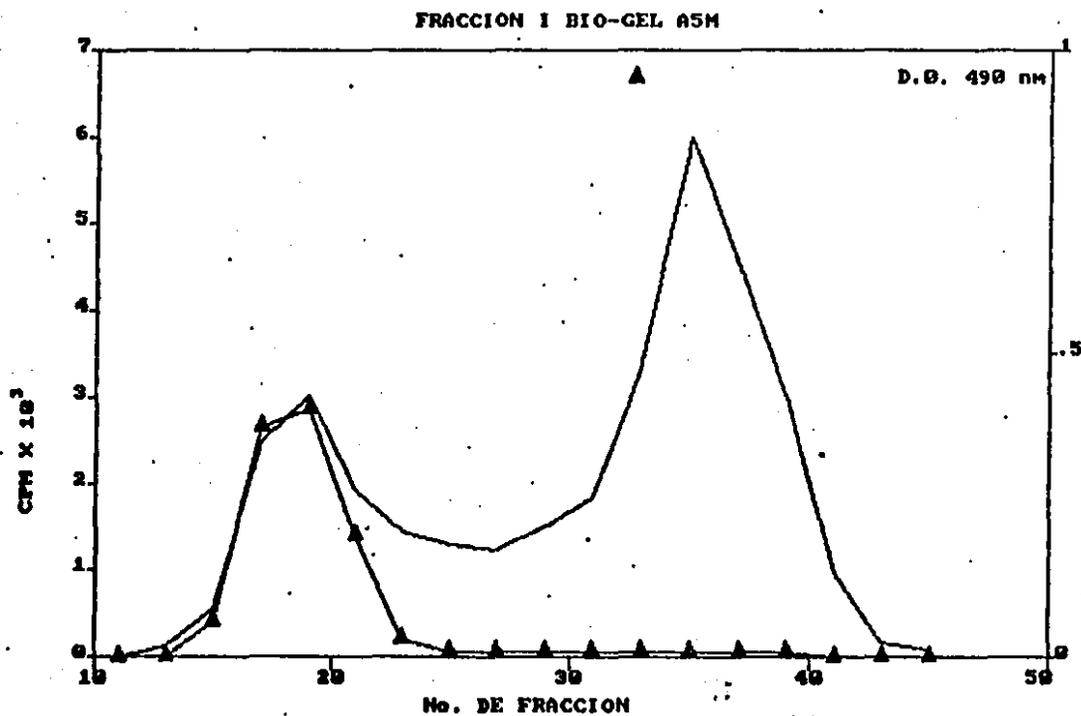


FIG. 16. CRDMATOGRAFIA EN BIO-GEL A5M DE LA FRACCION I

FRACCION II BIO-GEL A5M

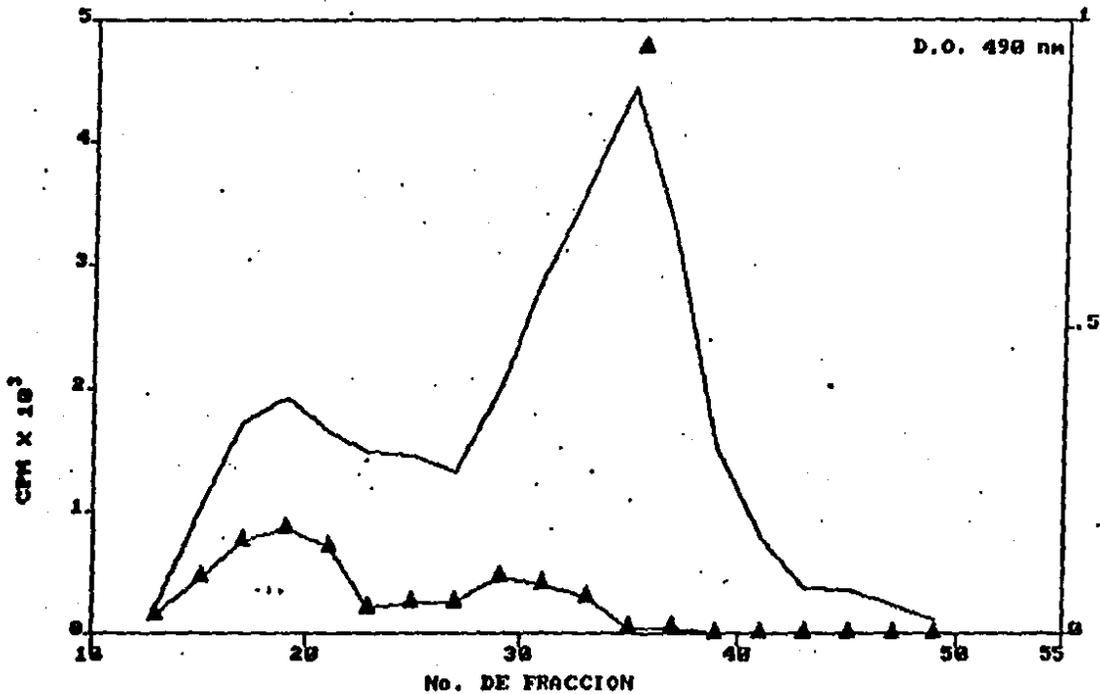


FIG. 17 CROMATOGRAFIA EN BIO-GEL A5M DE LA FRACCION II.

La fracción III da un perfil de elución característico de moléculas agregadas ya que el pico de carbohidratos sale en el espacio incluido. La explicación de los otros picos que salen en el volumen incluido puede ser la misma que para la fracción I (figura 18).

La fracción IV tiene un comportamiento de elución especial, pues el polisacárido no solamente seguido por su marcaje sino también por su capacidad de dar reacción positiva al fenol-sulfúrico, leviga en el espacio incluido (figura 19).

Con los resultados obtenidos de fraccionamiento por columnas de separación molecular, podemos señalar que desde el punto de vista físico las 3 primeras fracciones se encuentran probablemente agregadas mientras que la cuarta no, ya que con soluciones amortiguadoras fisiológicas sale en el volumen incluido. Ante esto, lo lógico sería trabajar con la última fracción, sin embargo desde el punto de vista inmunológico y bioquímico la molécula polisacarídica más característica es la tercera. Con el fin de corroborar la agregación de este polisacárido se realizaron 2 experimentos.

El primero consistió en pasar de nuevo la fracción III sobre una columna cuyo tamiz fuera capaz de separar moléculas de mayor peso molecular. Los resultados se encuentran en la figura 20, y como puede observarse, el polisacárido sigue saliendo en el volumen de exclusión.

El segundo experimento consistió en pasar de nuevo la fracción III sobre una columna de Bio-gel A5M, pero en esta ocasión se agregó a la solución amortiguadora, SDS al 1%. Como se puede apreciar en la figura 21 con este tratamiento el polisacárido pudo salir en el volumen de inclusión. El perfil de levigación tan heterogéneo de este polisacárido, hace sospechar que probablemente está constituida por unidades oligosacarídicas de repetición de diferentes pesos moleculares y que su agregación se deba a la presencia de la porción lipídica.

7. ANÁLISIS INMUNOENZIMÁTICO { ELISA }.

Los resultados obtenidos en la optimización de la prueba de ELISA cuando se usó la fracción III como antígeno se muestra en la figura 22.

Como se puede observar en ella, las condiciones ideales se lograron cuando el antígeno se usó 5 µg/ml, con una dilución del primero y segundo anticuerpo de 1:400 y 1:1000 respectivamente.

Por otro lado la prueba de ELISA se realizó con el antígeno total de amiba a una concentración del mismo de 5 µg/ml, con las diluciones del primero y segundo anticuerpo de 1:400 y 1:1000 respectivamente.

Los resultados de la prueba de ELISA para el antígeno total comparando sujetos normales con pacientes con diagnóstico de AHA se encuentran en la figura 23; como puede observarse en ella, las diferencias entre las 2 poblaciones no son significativas, puesto que la p es .

En la figura 24 se encuentran los resultados por ELISA entre sujetos normales y pacientes con AHA cuando se empleó la fracción III.

En ella se observa que hay una gran diferencia significativa entre los dos grupos con una p de .

FRACCION III BIO-GEL A5M

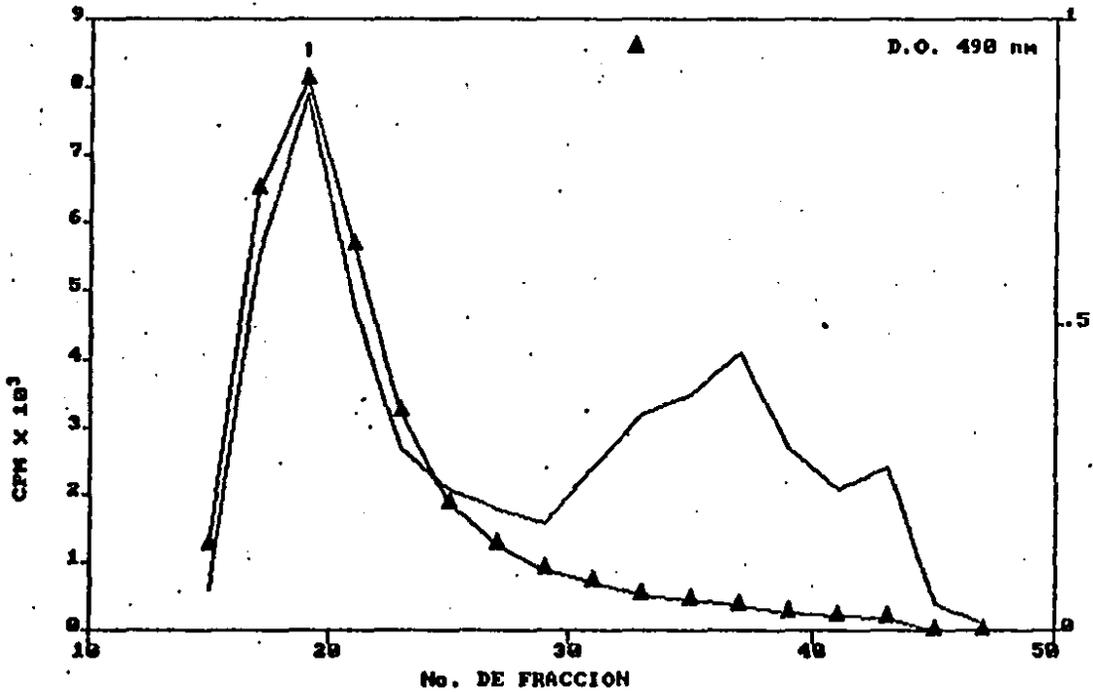


FIG. 18 CROMATOGRAFIA EN BIO-GEL A5M DE LA FRACCION III.

FRACCION IV BIO-GEL A5M

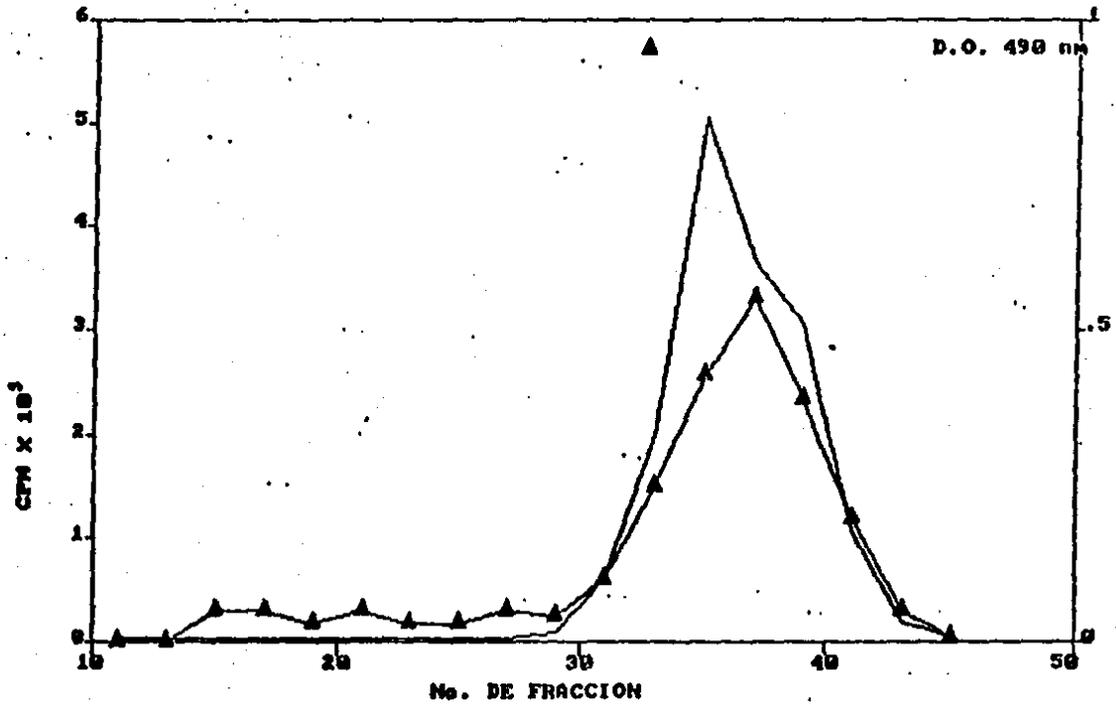


FIG. 10 CROMATOGRAFIA EN BIO-GEL A5M
DE LA FRACCION IV

FRACCION III BIO-GEL A150M

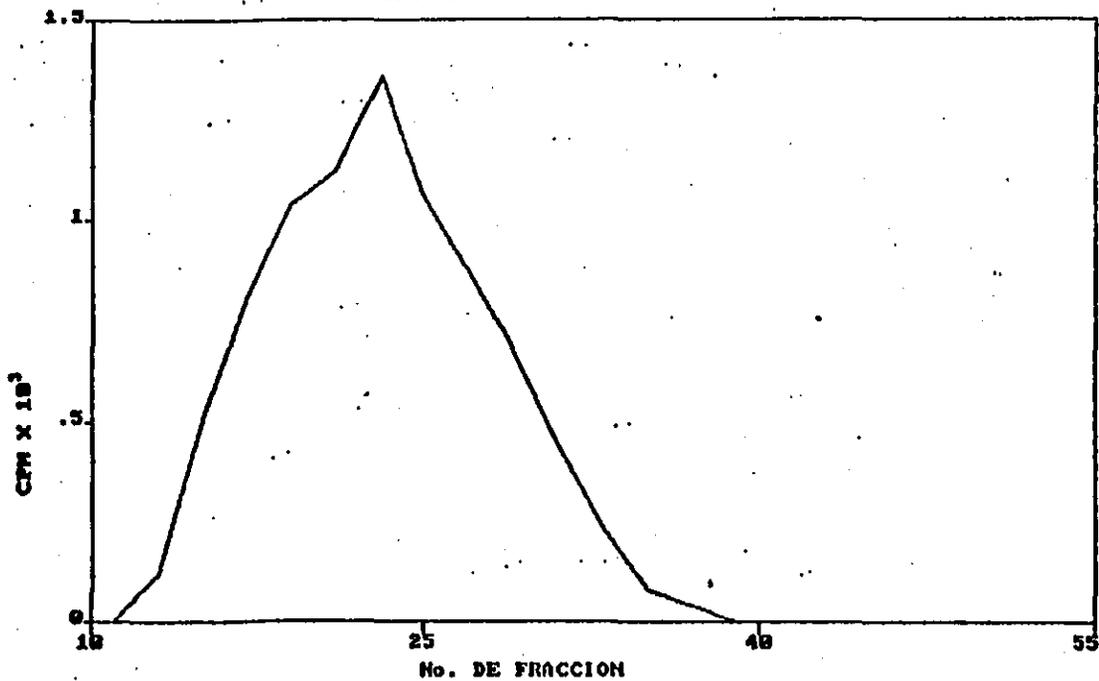


FIG. 20: CROMATOGRAFIA EN BIO-GEL A150M DE LA FRACCION III.

FRACCION III, BIO-GEL ASM. SDS

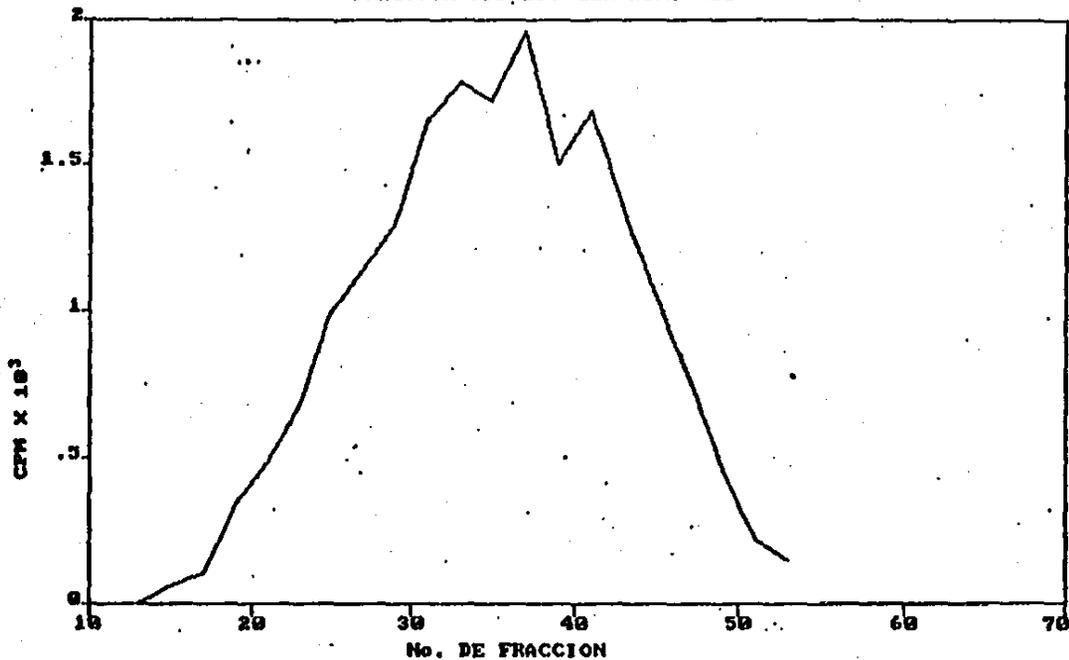
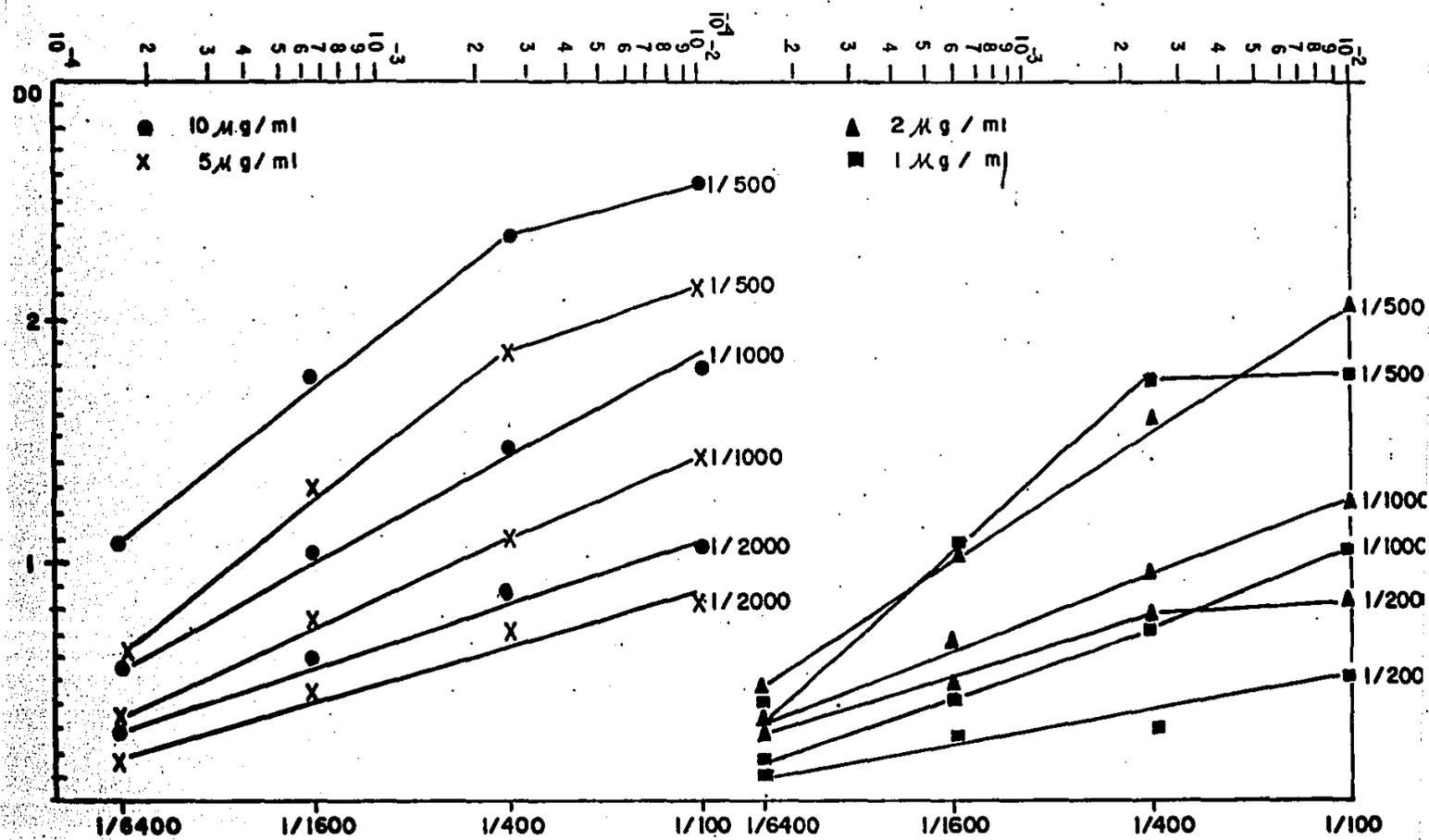


FIG. 21 CROMATOGRAFIA EN BIO-GEL ASM DE LA FRACCION III
BBS: NaCl: SDS 1%



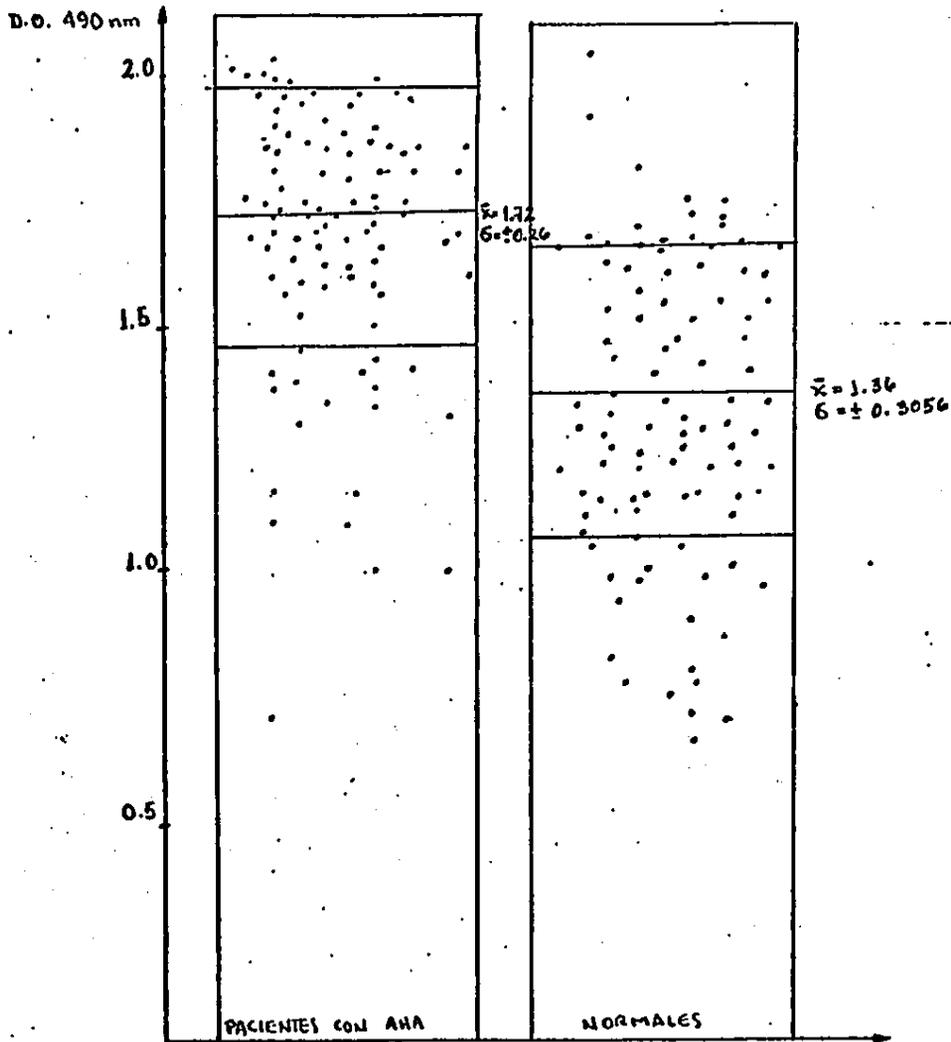


Fig. 23. Determinación mediante el método de ELISA de anticuerpos anti-amiba en el suero de pacientes con AHA. Antígeno crudo 5 μ g/ml; suero de AHA y normales diluidos 1:400, suero de cabra anti-inmunoglobulinas humanas diluidas 1:1000.

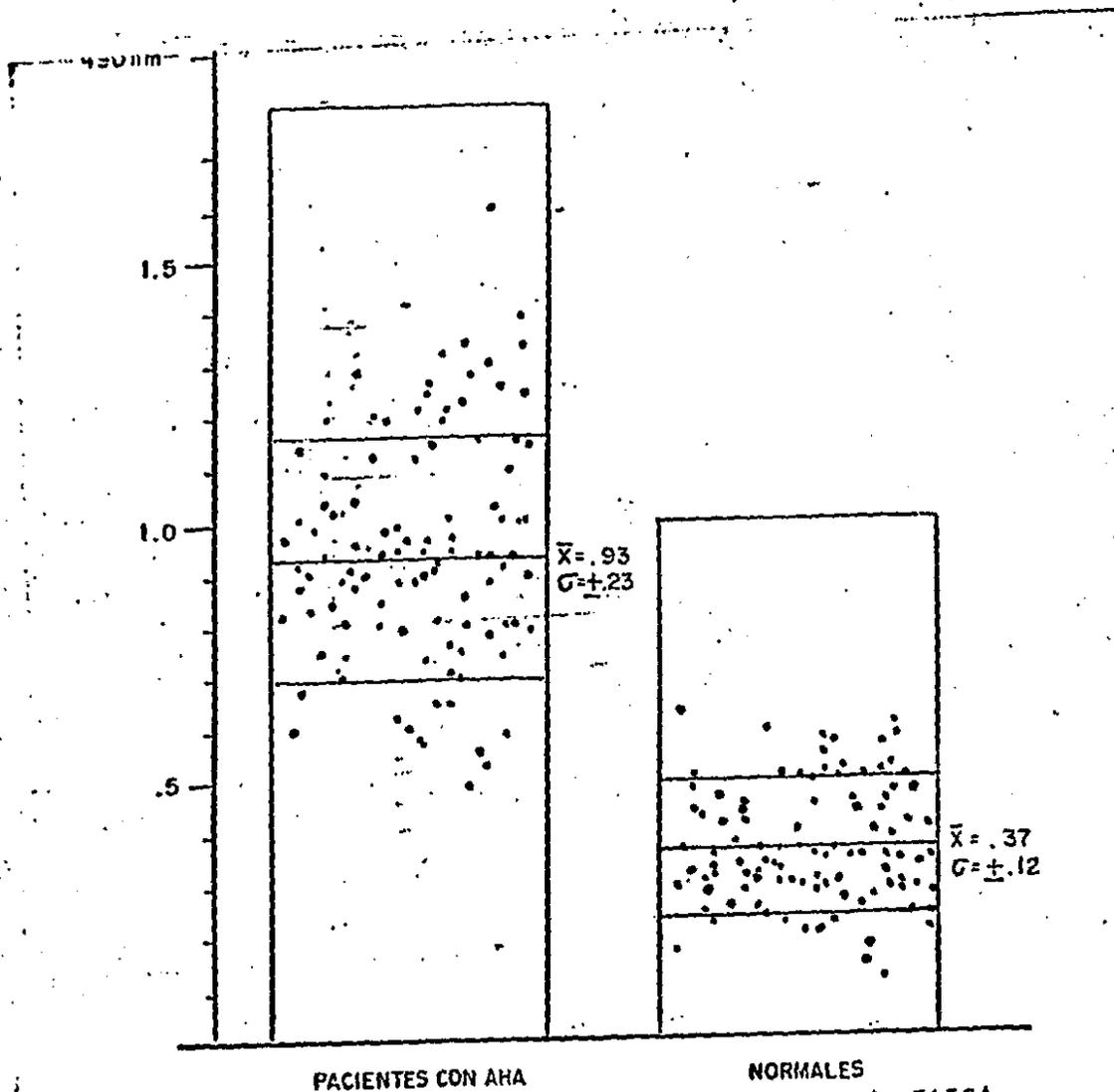


Fig. 24. Determinación mediante el método de ELISA de anticuerpos anti-LPFG en el suero de pacientes con AHA y normales diluidos 1:400, suero de cabra anti-inmunoglobulinas humanas diluido 1:1000; antígeno 5 ug/ml.

Estos resultados permiten señalar que la fracción III no sólo es la mejor desde el punto de vista inmunoquímico sino también sirve para discriminar perfectamente pacientes con AHA de sujetos normales.

DISCUSION.

Para poder estudiar la participación del sistema inmune en la amibiasis es necesario definir y caracterizar a los antígenos amibianos que son reconocidos durante la infección. El cultivo de *E. histolytica* en medio axénico ha sentado las bases para separar a los antígenos amibianos, y estudiar sus características inmunológicas. Los antígenos más usados hasta la fecha son células completas o sus homogenizados, así como fracciones solubles y particuladas (80). Los antígenos de *E. histolytica* que se encuentran en la superficie son los de mayor interés, ya que son los primeros en ser reconocidos por el sistema inmune durante la infección. Hasta ahora han sido descritas algunas proteínas y glicoproteínas aisladas de la membrana plasmática amibiana (7, 5).

Utilizando microscopia electrónica se han demostrado antígenos de superficie, usando anticuerpos de pacientes con amibiasis (81). Se ha demostrado que los antígenos de superficie deben contener carbohidratos (9) ya que se unen específicamente a la concanavalina A.

En trabajos previos se ha descrito el aislamiento de una molécula de superficie de naturaleza polisacáridica denominada lipopeptidofosfoglicana (LPFG) (61). Esta molécula reaccionó tanto con los sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano como con el suero de conejo inmunizado con trofozoítos de *E. histolytica*. Gitler y cols (82) encontraron que la LPFG era muy antigénica y que presentaba reacción cruzada con un aminoglicofosfolípido extraído por ellos.

La LPFG resultó ser una molécula muy heterogénea, por lo que se decidió tratar de obtenerla por diferentes métodos y estudiar su comportamiento. De los productos obtenidos por los dos métodos se demostró que los mejores polisacáridos fueron aquellos que se extrajeron por fenol-agua (fracciones III y IV) ya que las obtenidas por hidrólisis acética y precipitaciones alcohólicas tenían un porcentaje mas bajo de azúcares (fracciones I y II).

El estudio de la reactividad de los sueros de pacientes con AHA por medio de la doble inmunodifusión y el método de cohetes de Laurell reveló que la fracción III fue la que más veces fue reconocida y en la inmunoelectroforésis bidimensional también fue ella la que dió bandas características de precipitación tanto ante el suero de conejo anti-amiba como contra un suero de paciente con AHA.

Cuando se trató de estudiar el comportamiento electroforético de los 4 polisacáridos, se encontró que éstos no tuvieron corrimiento característico ya que aparentemente no lograban penetrar el gel, sin embargo cuando los geles se cortaron en trozos de 3mm de longitud y se revelaron para azúcares por el método de fenol-sulfúrico, se encontró que aún cuando una gran parte de las fracciones III y IV quedaban en el inicio del corrimiento, parte de ella lograba entrar en el gel.

Estos resultados hicieron suponer que los antígenos polisacáridicos se encontraban agregados. Lo anterior se corroboró cuando 3 de las fracciones (I,II y III) que se hicieron pasar por diferentes columnas de cromatografía de exclusión molecular sa-

lieron en el espacio muerto cuando se emplearon soluciones fisiológicas como fase móvil. La fracción IV fue la única que salió en el espacio incluido. En principio, por esta circunstancia, hubiera sido interesante que se continuara estudiando la fracción IV; esto no se hizo por que reacciono menos que la fracción III con los diferentes métodos inmunológicos estudiados y además por que tenía una mayor contaminación por proteínas.

La fracción III se pudo desagregar cuando se pasó por la columna con soluciones fisiológicas agregadas de SDS y mostró a través de marcaje con borhidruro de sodio tritiado que probablemente estaba constituido por oligosacáridos de repetición con diferentes pesos moleculares.

Por los resultados inmunoquímicos encontrados se decidió que la fracción III era la mejor.

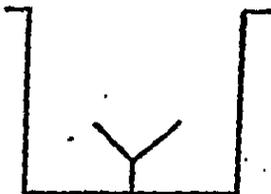
El estudio de los sueros de pacientes con AHA demostró que con la fracción III era posible distinguir por la prueba de ELISA, los enfermos de AHA de sujetos normales; mientras que esto no sucedía con un antígeno amibiano total.

El polisacárido obtenido a través del método de fenol-agua modificado (fracción III) es el que en un futuro se empleará para determinar su estructura química así como su función biológica.

Por otro lado, resultados preliminares han demostrado, que el antígeno polisacarídico en estudio, puede ser determinado por medio de la prueba de ELISA (figs 25 y 26).

ELISA
(MÉTODO DEL DOBLE ENPAREDADO)

1. -RECUBRIR CON Ig HUMANA
HIPERINMUNE ANTI LPFG

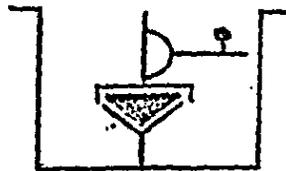
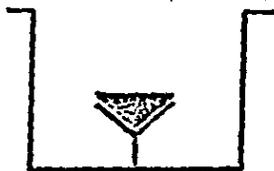


7. -INCUBAR CON Ig DE CONEJO
HIPERINMUNE ANTI LPFG



2. -LAVAR CON PBS-TWEEN 0.1%
3. -BLOQUEAR CON PBS-GELATINA 0.5%
4. -LAVAR CON PBS-TWEEN 0.1%
5. -INCUBAR LPFG 1hr/37°C y 4hr/4°C

8. -LAVAR CON PBS-TWEEN 0.1%
9. -INCUBAR CON Ig DE CABRA
ANTI Ig DE CONEJO 1hr/37°C



6. -LAVAR CON PBS-TWEEN 0.1%

10. -LAVAR CON PBS-TWEEN 0.1%
11. -PONER EL SUSTRATO (OPD, H₂O₂)
12. -LEER A 490 nm.

Fig. 25. Esquematización del método de ELISA para la determinación de antígeno ambiental en heces fecales.

DETERMINACION DE LPFG POR ELISA

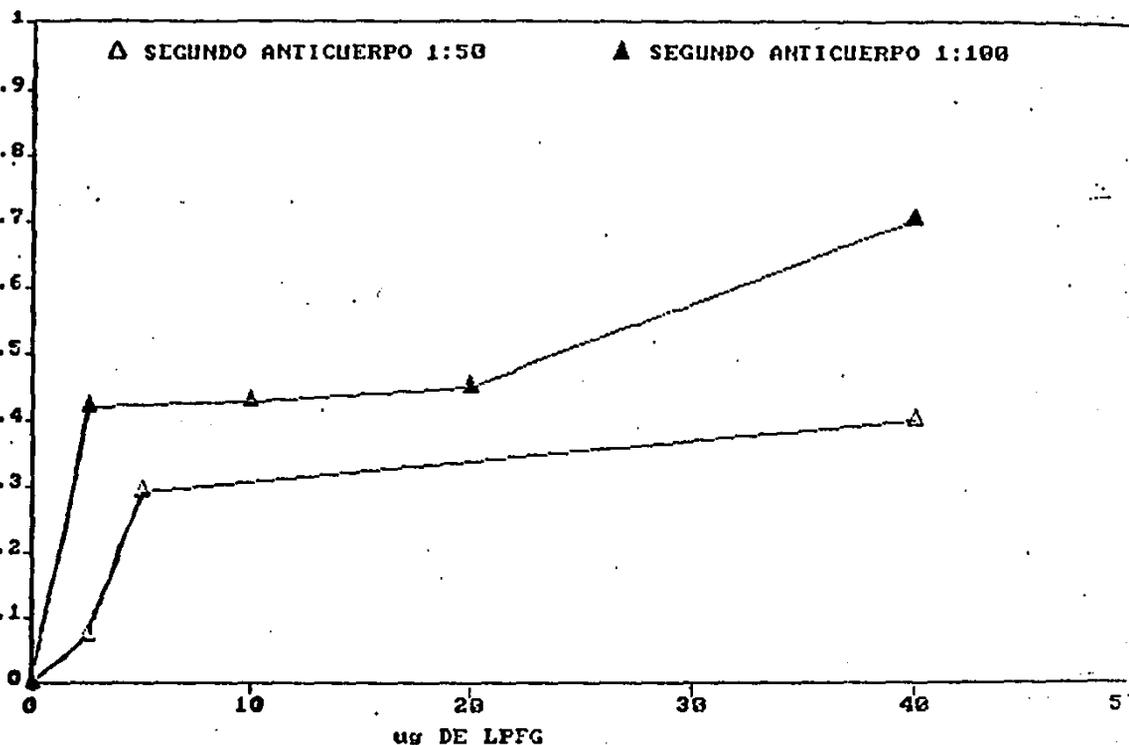


FIG. 26. Determinación de LPFG en solución mediante el método de ELISA. 1er anticuerpo: gammaglobulina de paciente con AHA diluido 1:20; ag 40, 20, 10, 5 y 2.5 ug/ml. 2o. ac: suero de conejo anti-LPFG diluido 1:50, 1:100; suero de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a peroxidasa diluido 1:1000.

BIBLIOGRAFIA.

1. Walker, E. L. y Sellards A. W. Experimental entamoebic dysentery. Philippine Journal of Science. B. Tropical Medicine. 1913, 8, 253.
2. Sawyer, M.K., Bishop, J. M., Guidry, M. A., Reeves, R. E. Lipids from *Entamoeba histolytica*. Experimental Parasitology. 1967, 20, 295.
3. Cerbón, J. y Flores, J. Phospholipid composition and turnover of pathogenic amebas. Comparative Biochemistry and Physiology. 1981, 69B, 487.
4. Mc Laughlin, J. y Meerovitch E. The surface and cytoplasmic membranes of *Entamoeba invadens*. II. Polypeptide and phospholipid composition. Comparative Biochemistry and Physiology. 1975, 52B, 487.
5. Aley, S.B., Scott, W. A., Cohn, Z. A. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. Journal of Experimental Medicine. 1980, 152, 391.
6. Mc Laughlin, J. y Meerovitch, E. The surface and cytoplasmic membranes of *Entamoeba invadens*. I. Gross chemical and enzymatic properties. Comparative Biochemistry and Physiology. 1975, 52B, 477.
7. Serrano, R., Deas, J. E., Warren, G. *Entamoeba histolytica*: Membrane fractions. Experimental Parasitology. 1977, 41, 370.
8. Pinto da Silva, P., A. Martínez-Palomo y A. González-Robles. Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. Topochemistry and dynamics of the cell surface: cap formation and microexudate. Journal of Cell Biology. 1975, 64, 538.
9. Martínez-Palomo, A., A. González-Robles y M. De la Torre. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by concanavalina A. Nature New Biology. 1973, 245, 186.
10. Trissl, D., A. Martínez-Palomo, C. Arguello, M. de la Torre y R. de la Hoz. Surface properties related to concanavalin A- induced agglutination. A comparative study of several *Entamoeba* strains. Journal of Experimental Medicine. 1977, 145, 652.
11. Sen, A., S. N. Gosh, S. Mukerjee y J. C. Ray. Antigenic structure of *Entamoeba histolytica*. Nature. 1961, 192, 893.
12. Lunde, M.N. y L.S. Diamond. Studies on antigens from axenically cultivated *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba-like* amebae. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1969, 18, 1.
13. Alam, M. y S. Ahmad. Immunogenicity of *Entamoeba histolytica* antigen fractions. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1974, 68, 370.
14. Krupp, I. M. Definition of the antigenic pattern of *Entamoeba histolytica* and immunoelectrophoretic analysis of the variations of patient response to amebic disease. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1977, 26, 387.
15. Bos, H. The problem of pathogenicity in parasitic *Entamoeba*. Acta Leidensia. 1973, 40, 1.
16. Chang, S. H., C. M. Lin, D. G. Dusanic y J.H. Cross.

Antigenic analyses of two axenized strains of *Entamoeba histolytica* by two-dimensional immunoelectrophoresis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1979, 28, 845.

17. Sawhney, S., R. N. Cha Kravarti, P. Jain y V. K. Vinayak. Immunogenicity of axenic *Entamoeba histolytica* antigen and its fractions. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1980, 74, 26.

18. Ruiz-Castañeda, M., M. de la Torre y M. Aubanel. Investigación de antígeno circulante en amibiasis invasora. Gaceta Médica de México. 1976, 112, 393.

19. Mahajan, R.C. y N. K. Ganguly. Amoebic antigen in immunodiagnosis and prognosis of amoebic liver abscess. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1980, 74, 300.

20. Ortiz-Ortiz, L., R. Gómez y S. Estrada-Parra. Existen complejos inmunes en el suero de pacientes con absceso hepático amibiano ?. Archivos de Investigación Médica (México). 1974, 5, suppl 2, 491.

21. Meerovitch, E., D. P. Hartman y E. Ghadirian. Protective immunity and possible autoimmune regulation in amebiasis. Archivos de Investigación Médica (México). 1978, 9, suppl. 1, 247.

22. Palacios, O., R. de la Hoz y H. Sosa. Determinación del antígeno amibiano en heces por el método de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) para la identificación de *Entamoeba histolytica*. Archivos de Investigación Médica (México). 1978, 9, suppl. 1, 339.

23. Boonpucknavig, S., G. S. Lynraven, R. C. Nairn y H. A. Ward. Subcellular localization of *Entamoeba histolytica* antigen. Nature. 1967, 216, 1232.

24. Arroyo-Begovich, A. Inducción de inmunidad protectora anti-amibiana con "nuevos antígenos" en el hámster lactante. B. Material antigénico. Archivos de Investigación Médica (México). 1978, 9, suppl. 1, 311.

25. O'Shea, M. S. y A. Fera-Velasco. Demostración ultramicroscópica de antígenos de superficie en trofozoítos de *E. histolytica* por inmunofluorescencia con IGG humana específica. Archivos de Investigación Médica (México). 1974, 5, suppl. 2, 307.

26. Calderón, J., M. L. Muñoz y H. M. Acosta. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in Entamoebae. Journal of Experimental Medicine. 1980, 151, 184.

27. Acosta, G. R. Campos, C. Barranco, A. Isibasi y J. Kumate. Secretory IGA antibodies from bile of immunized rats reactive with trophozoites of *Entamoeba histolytica*. Annals New York Acad. of Sciences. 1983, 409, 760.

28. Sepúlveda, B., E. Lee, M. de la Torre y L. Landa. El diagnóstico serológico de la amibiasis invasora con la técnica de la inmunoelectroforesis cruzada. Archivos de Investigación Médica (México). 1971, 2, suppl., 263.

29. Sepúlveda, B., M. Aubanel, L. Landa y G. Velázquez. Avances en la técnica de contra-inmunoelectroforesis para el estudio serológico de la amibiasis. Archivos de Investigación Médica (México). 1972, 3, suppl. 2, 363.

30. Sepúlveda, B. Reacciones de hemaglutinación y de precipitación con antígeno amibiano axénico en amibiasis invasora.

- Archivos de Investigación Médica (México). 1970, 1, suppl., siii.
31. Maddison, S. E., I. G. Kagan y R. Edson-Dew. Comparison of intradermal and serologic tests for the diagnosis of amebiasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1968, 17, 540.
32. Lee, E., O. Palacios y R. Kretschmer. localización del anticuerpo antiamebiano en las inmunoglobulinas de suero humano. Archivos de Investigación Médica (México). 1970, 1, suppl. s101.
33. Perches, A., R. Kretschmer, E. Lee y B. Sepúlveda. Determinación de inmunoglobulinas del suero de pacientes con amebiasis invasora. Archivos de Investigación Médica (México). 1970, 1, suppl., s97.
34. Arellano, M. T. y L. Ortiz-Ortiz. Algunas propiedades de la globulina específica del suero de pacientes con absceso hepático amebiano. Archivos de Investigación Médica (México). 1974, 5, suppl. 2, 487.
35. Chévez, A., I. Iturbe-Alessio, B. Sepúlveda, M. Segura y L. Ortiz-Ortiz. Respuesta morfodinámica de los trofozoítos de *E. histolytica* a la acción del suero humano inmune correspondiente. Archivos de Investigación Médica (México). 1973, 4, suppl. 1, 71.
36. Sepúlveda, B., A. Chévez, I. Iturbe-Alessio y L. Ortiz-Ortiz. Efecto de la gammaglobulina inmune anti-amebiana sobre el trofozoíto de *E. histolytica*. Archivos de Investigación Médica (México). 1973, 4, suppl. 1, s79.
37. Sepúlveda, B., L. Ortiz-Ortiz, A. Chévez y M. Segura. Comprobación de la naturaleza inmunológica del efecto del suero y de la gammaglobulina inmune sobre el trofozoíto de *E. histolytica*. Archivos de Investigación Médica (México). 1974, 5, suppl. 2, 343.
38. Sepúlveda, B., M. Tanimoto-Weki, P. Calderón y R. de la Hoz. Inducción de inmunidad pasiva anti-amebiana en el hámster por la inyección de suero inmune. Archivos de Investigación Médica (México). 1974, 5, suppl. 2, 451.
39. Ortiz-Ortiz, L., N. R. Capín, B. Sepúlveda y G. Zamacona. Activation of the alternative pathway of complement by *Entamoeba histolytica*. Clinical and Experimental Immunology. 1978, 34, 10.
40. Huldtt, G., P. Davies, A. C. Allison y H. U. Schorlemmer. Interactions between *Entamoeba histolytica* and complement. Nature. 1979, 277, 214.
41. Capín, R., N. R. Capín, M. Carmona y L. Ortiz-Ortiz. Effect of complement depletion on the induction of amebic liver abscess in the hamster. Archivos de Investigación Médica (México). 1980, 11, suppl. 1, 173.
42. Krupp, I. M. y J. Powell. Comparative study of the antibody response in amebiasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1971, 20, 421.
43. Healy, G. R., G. S. Visvesvara e I. G. Kagan. Observations on the persistence of antibodies to *E. histolytica*. Archivos de Investigación Médica (México). 1974, 5, suppl. 2, 495.
44. Miller, M. J., F. Scott y E. F. Foster. An evaluation of immunological indicators for amebic disease prevalence. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1973, 22, 331.
45. Savanat, T., D. Bunnag, T. Chongsuphajsiddhi y P.

- Viriyand. Skin test for amebiasis: An Appraisal. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1973, 22, 168.
46. Kretschmer, R., B. Sepúlveda, A. Almazán y F. Gamboa. Intradermal reactions to an antigen (histolytcin) obtained from axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. Tropical and Geographical Medicine. 1972, 24, 275.
47. Ortiz-Ortiz L., G. Zamacona, B. Sepúlveda y R. N. Capin. Cell-mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. Clinical Immunology and Immunopathology. 1975, 4, 127.
48. Landa, L., R. Capin y M. Guerrero. Studies on cellular immunity in invasive amebiasis. En: Proceedings of the International Conference on Amebiasis. Ed. B. Sepúlveda and L. S. Diamond. Instituto Mexicano del Seguro Social. 1976, 661.
49. Harris, W. G. y R. S. Bray. Cellular sensitivity in amoebiasis. Preliminary results of lymphocytic transformation in response to specific antigen and to mitogen in carrier and disease states. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1976, 70, 340.
50. Gold, G. L. G. Norman, S. E. Maddison e I. G. Kagan. Immunologic studies on hamsters infected with *Entamoeba histolytica*. Journal of Parasitology. 1978, 64, 866.
51. Tanimoto-Weki, M., P. Calderón, R. de la Hoz y J. Aguirre-García. Inoculación de trofozoítos de *E. histolytica* en hámster bajo la acción de drogas inmunosupresoras. Archivos de Investigación Médica (México). 1974, 5, suppl. 2, 441.
52. Wijesundera, M. de S. Hepatic amoebiasis in immunodepressed mice. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1980, 74, 216.
53. Savanat, T., P. Viriyand y N. Nimitmongkol. Blast transformation of lymphocytes in amebiasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1973, 22, 705.
54. Segovia, E., R. Capin y L. Landa. Transformación blastoide de linfocitos estimulados con antígeno lisosomal en pacientes con amebiasis intestinal. Archivos de Investigación Médica (México). 1980, 11, suppl. 1, 225.
55. Sepúlveda, B., M. Tanimoto-Weki, A. Guerrero y G. Solís. Inmunidad en hámsters consecutiva a vacunación con cultivos monoxénicos y axénicos de *E. histolytica*. Archivos de Investigación Médica (México). 1973, 4, suppl. 1, s159.
56. Tanimoto-Weki, M., J. Vázquez-Saavedra, P. Calderón y J. Aguirre-García. Inmunidad consecutiva a la inyección de antígeno ambiano axénico en el hámster. Archivos de Investigación Médica (México). 1973, 4, suppl. 1, s147.
57. Sepúlveda, B., A. Arroyo-Begovich, M. Tanimoto-Weki, A. Martínez-Palomo y L. Ortiz-Ortiz. Inducción de inmunidad protectora anti-amibiana con "nuevos" antígenos en el hámster lactante. Archivos de Investigación Médica (México). 1978, 9, suppl. 1, 309.
58. Ghadirian, E. y E. Meerovitch. Vaccination against hepatic amebiasis in hamsters. Journal of Parasitology. 1978, 64, 742.
59. Krupp, I. M., Protective Immunity to amebic infection demonstrated in guinea pigs. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1974, 23, 355.
60. Vinayak, V. K., S. Sawhney, P. Jain y R. N. Chakravarti.

- Protective effects of crude and chromatographic fractions of axenic *Entamoeba histolytica* in guinea pigs. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1980, 74, 483.
61. Isibasi, A., M. S. Cruz, A. Ramirez y col. Inmunoquímica de una lipopeptidofosfoglicana obtenida de trofozoitos de *E. histolytica* cepa HK9 cultivados en medio axénico, utilizando el método fenol-agua. Arch. Invest. Med. (Méx.). 1982, 13, suppl. 51.
 62. Isibasi A., M. S. Cruz, M. Coutlieb y J. Kumate. Purificación de la porción polisacarídica de la lipopeptidofosfoglicana extraída de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. Archivos de Investigación Médica (México). 1986, 17, suppl. 1, 73.
 63. Diamond, L. S. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Progress and problems. Archivos de Investigación Médica (México) 1980, 11, suppl. 1, 47.
 64. White, P. B. J. Pathol. Bacteriol. 1931, 34, 325.
 65. Freeman, G. G. Biochem. J. 1943, 37, 601.
 66. Staub, A. M. Somatic degraded polysaccharide of Gram negative bacteria. Methods in Carbohydrate Chemistry. 1965, 5, 93.
 67. Westphal, O. y K. Jann. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol water and further applications of the procedure. Methods in Carbohydrate Chemistry. 1965, 5, 83.
 68. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, J. K. Rebers, P. A. y F. Smith. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 1956, 28, 350.
 69. Rondle, C. J. M. y W. T. J. Morgan. The determination of glucosamine and galactosamine. Bioch. J. 1955, 61, 586.
 70. Macheboeuf, M. y J. Delsal. Sur le dosage de très petites quantités de phosphore dans de matières organiques. Bul. Soc. Chim. Biol. 1943, 25, 116.
 71. Chen, P. S., T. Y. Toribara y M. Warner. Microdetermination of phosphorus. Anal. Chem. 1956, 28, 1756.
 72. Lowry, O. H. N. J. Rosenbrough, A. L. Farr y col. Protein measurement with the phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 3, 73.
 73. Ouchterlony, O. Acta Path. Microbiol. Scand.. 1949, 26, 507.
 74. A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Methods and applications. Scandinavian Journal of Immunology. Vol. 2, supplement No. 1. 1973. Edited by N. H. Axelsen, J. Kroll y B. Weeke. p. 37.
 75. A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Methods and applications. Scandinavian Journal of Immunology. Vol. 2, suppl. No. 1. 1973. Edited by N. H. Axelsen, J. Kroll y B. Weeke p. 47.
 76. Margolis, J. y Kenrick, K. G. Nature. 1967, 214, 1334.
 77. Ornstein, L. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964, 121, 321.
 78. Shapiro, A. L., Vinuela, E. y Maizel, J. B. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967, 28, 815.
 79. Weber, K. y Osborn, M. J. Biol. Chem. 1969, 244, 4406.
 80. Alpenfels, W. F. A rapid and sensitive method for the determination of monosaccharides as their dansyl hidrazones by high-performance liquid chromatography. Annal. Biochem. 1981, 114, 153.
 81. Parkhouse, M., M. E. Cid y J. Calderón. Identificación de

antigenos de membrana de *Entamoeba histolytica* con anticuerpos de pacientes de amebiasis. Arch. Invest. Méd. (Méx). 1978, 9 suppl. 1, 211.

82. Gitler, C., E. Calef, I. Rosenberg. Citopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. 1984, 307, 73.