

2 ej.  
165



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

AISLAMIENTO, PURIFICACION PARCIAL Y  
CARACTERIZACION DE ANTIGENOS DE  
COMPLEJOS SOLUBLES DE Entamoeba histolytica  
(HM1:IMSS).

T E S I S  
Que para obtener el Título de  
B I O L O G O

Presenta:

María del Carmen Ramírez Rivero



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.

## CONTENIDO.

I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	7
III. MATERIAL Y METODOS	8
1. Cultivo axénico de trofozoítos	8
2. Aislamiento de membranas y complejos solubles del trofozoito de <u>Entamoeba histolytica</u>	9
3. Solubilización de glicoproteínas	11
4. Determinación de proteínas por el método de Lowry	13
5. Determinación de azúcares por el método fenol-sulfúrico	14
6. Determinación de peso seco por evaporación	15
7. Porcentaje de cada fracción celular de <u>E. histolytica</u>	16
8. Purificación de antígenos de complejos solubles	16
8.1. Filtración en gel del material liofilizado	17
8.2. Precipitación fraccionada y filtración en gel del material recién aislado	18
9. Electroforesis en gel de poliacrilamida	20
10. Reacciones inmunológicas	24
10.1. Obtención de antisuero de conejo	24
10.2. Doble inmunodifusión	25
10.3. Inmunolectroforesis	26
10.4. Determinación de anticuerpos anti <i>Entamoeba</i> por hemaglutinación pasiva	27
IV. RESULTADOS	30
V. DISCUSION	40
VI. CONCLUSION	45
VII. BIBLIOGRAFIA	46

## I. INTRODUCCION.

Se puede definir la amibiasis como la condición de hospedar al protozoario Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903, con o sin manifestaciones clínicas (7). Esta especie generalmente se localiza en el humano como comensal en la luz del intestino grueso (amibiasis luminal), 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 (34).

Existen seis especies más de amibas que son parásitos naturales del humano: Entamoeba coli, E. hartmanni, E. gingivalis, Iodamoeba buetschlii, Dientamoeba fragilis y Endolimax nana; pero, solo E. histolytica es realmente patógena. Su distribución es cosmopolita y se estima que afecta a un 10% de la población mundial, si bien, su incidencia varía de un área a otra, siendo mayor en zonas tropicales y subtropicales y ciudades con condiciones sanitarias deficientes, donde prevalecen la pobreza, la ignorancia y la sobrepoblación (50). La amibiasis afecta principalmente a niños menores de cinco años, aunque también es frecuente en adultos del sexo masculino. En México ocupa los primeros lugares de morbilidad y mortalidad, lo que evidentemente tiene una gran repercusión social debido a su influencia en el rendimiento tanto laboral como escolar.

La investigación sobre la amibiasis se orientó inicialmente hacia su diagnóstico y tratamiento; paulatinamente su estudio se extendió hasta abarcar la morfología y fisiología amibianas, 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 inmunoprolifácticas eficaces para combatirlo.

Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903, es un protozoario anaeróbico perteneciente al Subphylum Sarcomastigophora, Superclase Sarcodina, Clase Rhizopodea, Orden Amoebida y Familia Endamoebidae (5). Su ciclo vital completo consiste de cuatro estadios consecutivos: trofozoíto, proquiste, quiste y meta-

quiste (26). El trofozoito se reproduce por fisión binaria, produciendo bajo condiciones apropiadas un quiste mononucleado que tras dos divisiones nucleares sucesivas forma un quiste tetranucleado típico. Este dá lugar a un metaquiste que por división origina ocho trofozoitos uninucleados. La transmisión a un nuevo huésped se realiza por la ingestión de quistes en alimmentos o agua contaminados.

El quiste presenta forma esférica u oval, con un diámetro de 8 a 20  $\mu\text{m}$  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 cariosoma que puede ser central, cuerpos cromatoidales y cromatina periférica adherida a la envoltura nuclear (34).

El trofozoito es una fase altamente dinámica y pleomórfica, su tamaño en cultivo in vitro varía de 15 a 30  $\mu$  dependiendo de las condiciones del medio (34). La membrana plasmática es similar a la de otras células eucariontes, con una cubierta celular apenas detectable (43). El citoplasma contiene diferentes organelos: cuerpos densos, ribosomas y polisomas, granulos osmiófilos, cuerpos helicoidales y cuerpos tubulares (32, 39); numerosas vacuolas alimenticias grandes, mayores a 2  $\mu\text{m}$ , y vesículas pequeñas, menores de 2  $\mu\text{m}$ , cuyas membranas poseen la misma estructura que la membrana plasmática (2, 32); presenta también lisosomas activos especializados de superficie (2, 14). La amiba carece de mitocondrias y aparato de Golgi, y su retículo endoplásmico consiste de vesículas finas rodeadas de algunos ribosomas (30, 32, 37). El núcleo es ovalado, con un nucléolo central y cromatina periférica, y contiene estructuras densas de probable naturaleza viral. La envoltura nuclear presenta gran cantidad de poros (32).

En las heces fecales de pacientes con amibiasis pueden localizarse tanto trofozoitos como quistes. Los trofozoitos se distinguen fácilmente de los de las especies pequeñas por su mayor tamaño, el quiste también es mayor al de otras amibas y es

posible diferenciarlo del quiste de E. coli (presente con mucha frecuencia), ya que este tiene ocho núcleos (34, 44). No obstante, el diagnóstico de la amibiasis basado en la identificación morfológica de E. histolytica requiere de gran experiencia y con frecuencia conduce a errores, lo que ocasiona la administración, en ocasiones innecesaria, de drogas amebicidas que si bien son generalmente efectivas, pueden producir daño iatrogénico al paciente por su toxicidad potencial (34). Por lo anterior, resulta de gran utilidad emplear simultáneamente el diagnóstico de cultivo de amibas de materia fecal desarrollado por Robinson (44), así como métodos serológicos tales como: hemaglutinación indirecta, aglutinación del látex, inmunodifusión e inmunoelectroforesis.

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 (7, 36, 49). Recientemente Sargeant y cols. diferenciaron las cepas patógenas de las no patógenas en base al patrón electroforético de cuatro isoenzimas específicas (45, 46). Este patrón es diferente para cepas aisladas de pacientes con manifestaciones clínicas y cepas de pacientes asintomáticos, y debido a su especificidad permite diferenciar fácilmente E. histolytica de otras entamoebas y de otros géneros de amibas, limitando así el tratamiento amebicida exclusivamente a los pacientes que hospeden amibas patógenas.

La patología de la amibiasis se caracteriza por daño masivo del tejido del huésped como resultado de citólisis contacto dependiente (7). El trofozoíto virulento mata las células por un proceso rápido que involucra como primer paso un contacto íntimo pero transitorio entre la membrana plasmática de la amiba y la de la célula blanco. En seguida la amiba libera factores citopáticos que inducen la pérdida del potencial transmembranal conduciendo a un estado prelítico de la célula huésped (14, 20). Finalmente, el trofozoíto fagocita total o parcialmente

la célula afectada y libera enzimas proteolíticas que la lisan (20,40).

Por lo que respecta a la respuesta inmune, en la mayoría de los casos sintomáticos los pacientes presentan anticuerpos circulantes dirigidos tanto contra determinantes de superficie como citoplásmicos; sin embargo, la respuesta inmune ni previene la infección ni altera el curso de la enfermedad (20). Al parecer la amiba evade el ataque inmunológico dispersando o internalizando el complejo antígeno-anticuerpo (6).

En los párrafos siguientes se resume el desarrollo de los métodos de identificación y análisis de moléculas antigénicas que han permitido llegar al conocimiento actual sobre los antígenos de E. histolytica. En un principio se trabajó básicamente con extractos acuosos de antígeno total, pero gradualmente se optó por la identificación cualitativa y cuantitativa de los antígenos amibianos más importantes, con el empleo de técnicas que involucran la ruptura del trofozoíto y centrifugaciones diferenciales.

En 1967 Boonpucknavig y cols. (4) aislaron mediante sonicación y centrifugación diferencial fracciones celulares de E. histolytica, y observaron que los antígenos amibianos se encuentran asociados principalmente a la fracción microsomal, lo que explicaría que la mayoría de las pruebas inmunológicas en casos de amibiasis asintomática sean negativas, ya que la amiba integra no expone sus endoantígenos al sistema inmune del huésped. Se postula que la célula completa del protozoario en los tejidos, escapa al reconocimiento antigénico.

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 (8) lo que permitió un rápido avance en estudios bioquímicos, nutricionales, patológicos e inmunológicos. En 1969 Lunde y Diamond al emplear antígeno total preparado mediante homogeneización de trofozoítos cultivados axénicamente, establecieron patrones inmu-

noelectroforéticos de diferentes cepas amibianas, y obtuvieron evidencias de que E. histolytica es inmunologicamente diferente a otras amibas de morfología similar (33).

Khan y Meerovitch en 1968 empleando trofozoítos de E. histolytica sonicados y liofilizados obtuvieron bandas de precipitación tanto con sueros de pacientes como con suero de conejo anti-E. histolytica, y observaron reacciones de identidad con antígenos de otras especies amibianas (22). Posteriormente, fraccionaron por filtración en gel de Sephadex un extracto acuoso de trofozoítos axénicos, y obtuvieron siete fracciones a las que determinaron propiedades fisicoquímicas e inmunológicas (23, 24). Más tarde, Alam y Ahmad en 1974 con técnicas similares demostraron la heterogeneidad de la composición antigénica de los trofozoítos (1).

En 1975 McLaughlin y Meerovitch al utilizar homogeneización y centrifugación en gradiente de densidad, aislaron membranas plasmáticas y membranas citoplásmicas de E. invadens, y detectaron la presencia de antígenos citoplásmicos asociados a vesículas de naturaleza lisosomal (37, 38).

Krupp en 1977 mediante el empleo de pruebas inmunológicas con sueros de pacientes de diferentes regiones geográficas, identificó catorce antígenos en trofozoítos de E. histolytica cultivados axénicamente (25). Poco después, en 1978 Parkhouse y cols. demostraron que los principales antígenos de membrana de E. histolytica que son reconocidos por sueros de pacientes son de naturaleza glicoproteica (41).

En 1980 Sawney y cols. por medio de filtración en gel de Sephadex de la porción soluble del antígeno total de trofozoítos de cultivo axénico de E. histolytica, purificaron parcialmente un antígeno glicoproteico de peso molecular elevado, con propiedades de hemaglutinación y precipitación similares a las mostradas por el extracto crudo (47).

Martínez-Palomo y cols. demostraron que la membrana plasmática de E. histolytica contiene residuos de manosa o glucosa que actúan como receptores a los que se une específicamente la



lectina concanavalina A (35, 43). En estudios posteriores se ha reportado que esta lectina aglutina en mayor proporción a las cepas patógenas de E. histolytica, lo que sugiere la existencia de un agrupamiento de receptores específicos para la concanavalina A en la membrana amibiana (19, 43).

En 1980 Aley y cols. empleando trofozoítos de E. histolytica cultivados axénicamente desarrollaron una metodología para el aislamiento de membrana plasmática basada en su unión específica con la concanavalina A, que estabiliza la membrana y evita su fragmentación, con lo que se facilita su separación. Mediante homogeneización y centrifugación diferencial en gradientes de densidad obtuvieron diferentes estructuras del trofozoíto por separado; así mismo, determinaron las propiedades químicas y enzimáticas de las fracciones celulares aisladas, e identificaron al menos doce componentes glicoprotéicos en la membrana plasmática (3). Posteriormente con la misma técnica y marcaje radiactivo con  $I^{125}$ , comprobaron que la membrana plasmática se interioriza como vesículas endocíticas, lo que indica un claro reciclaje de membrana (2).

Es importante notar que el método aportado por Aley y cols. abrió el camino de la investigación referente al aislamiento y caracterización química e inmunológica de los antígenos de superficie celular y de organelos membranosos, así como de otras moléculas citoplásmicas, lo cual conduce a su purificación y a la posibilidad de experimentar en la inducción de inmunidad protectora.

## II. OBJETIVOS.

La amibiasis invasiva es uno de los mayores problemas de salud en diversas regiones del mundo, debido a su alta frecuencia y su evidente repercusión social, resulta de especial interés toda investigación que produzca un mejor conocimiento del agente causal, a fin de lograr mejores métodos de diagnóstico, así como procedimientos terapéuticos y medidas inmunoproliféricas eficaces que permitan bajar los altos índices de mortalidad propios de este padecimiento y en última instancia erradicarlo. El presente trabajo consiste en la purificación de un antígeno amibiano que se empleará posteriormente en este laboratorio en investigaciones relativas a tales aspectos. Los objetivos planteados para su purificación y caracterización son los siguientes:

- Aislar membranas plasmáticas, membranas no vesiculadas, membranas internas y complejos solubles del trofozoito de Entamoeba histolytica (HM1:IMSS), aplicando el método de Aley.

- Determinar el porcentaje que se obtiene de cada fracción celular a partir del trofozoito intacto.

- Purificar antígenos proteicos de la fracción de complejos solubles, mediante precipitación con sales y filtración en gel de Sephadex.

- Obtener anticuerpos de conejo dirigidos contra antígenos de complejos solubles.

- Determinar la presencia de anticuerpos específicos para antígenos proteicos de complejos solubles, en suero de paciente con amibiasis intestinal o con absceso hepático amibiano.

- Caracterizar el patrón antigénico de las fracciones de complejos solubles frente al antisuero de conejo, por doble inmunodifusión e inmunoelectroforesis.

- Comparar dicho patrón antigénico con el obtenido al emplear las otras fracciones celulares del trofozoito.

### III. MATERIAL Y METODOS.

#### 1. CULTIVO AXENICO DE TROFOZOITOS.

Se realizó el cultivo axénico de trofozoitos de Entamoeba histolytica cepa HM1:IMSS en medio TYI-S-33 de acuerdo a la metodología descrita por Diamond (10, 11, 12).

##### 1.1. Preparación del medio de cultivo.

- Los constituyentes del medio de cultivo TYI-S-33 son: 26 g de peptona biotriptasa, 10 g de dextrosa, 2 g de cloruro de sodio, 0.6 g de fosfato de potasio monobásico, 1 g de fosfato de potasio dibásico, 1 g de cisteína, 0.2 g de ácido ascórbico y 22.8 mg de citrato de amonio férrico.

- Filtrar en Millipore 870 ml de agua destilada, previamente desionizada. Agregar y disolver cada uno de los reactivos. Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 1 N. Filtrar con papel de filtración rápida. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

- Inactivar suero bovino (Biorad) por calentamiento a 56 °C durante 30 minutos. En condiciones de extrema esterilidad agregar al medio 150 ml de suero bovino inactivo y 30 ml de mezcla vitamínica (Biorad).

- Mezclar y verter aproximadamente 75 ml del medio en matraces Erlenmeyer de 125 ml, con tapón de rosca.

##### 1.2. Siembra y cosecha de los trofozoitos.

- Tomar los tubos de cultivo de amibas que se encuentren en la fase logarítmica de su desarrollo, y sumergirlos durante 5 minutos en un baño de hielo, con lo cual se favorece el desprendimiento de los trofozoitos 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 trofozoitos, 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 0.85 % 6 en amortiguador de fosfatos salino pH 7.2, para su lavado posterior.

## 2. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS Y COMPLEJOS SOLUBLES DEL TROFOZOITO DE Entamoeba histolytica.

Aplicando la metodología de Aley y cols. (3) se realizó la fragmentación de los trofozoítos para obtener por separado las membranas internas, membranas no vesiculadas, membranas plasmáticas y los complejos solubles. Esta técnica se basa en la unión específica de la concanavalina A con los residuos de glucosa o manosa constituyentes de las glicoproteínas de la membrana plasmática. Tal enlace modifica la densidad de la membrana y ayuda a prevenir su fragmentación durante el aislamiento. La adición posterior de alfa metil manósido o glucosa libera a las glicoproteínas de su enlace a la Con A.

Soluciones.

a. Amortiguador de fosfatos salino (PBS) 0.15 M, pH 7.2.

Disolver en agua destilada cada una de las siguientes sales: 8 g de cloruro de sodio, 0.2 g de fosfato de potasio monobásico, 1.16 g de fosfato de sodio dibásico, y 0.2 g de cloruro de potasio. Mezclar las soluciones, ajustar a pH 7.2 y aforar a 1,000 ml.

b. PBS 0.15 M pH 7.2 adicionado de  $MgCl_2$  10 mM.

c. Concanavalina A.

Preparar una solución de Con A disuelta en PBS- $MgCl_2$  pH 7.2 a una concentración de 1 mg Con A/ml PBS- $MgCl_2$ .

d. Amortiguador TRIS: Tris 10 mM +  $MgCl_2$  1 mM + fenilmetil-sulfonilfluoruro (PMSF) 2 mM.

Disolver 1.2114 g de Tris (hidroximetilaminometano) en 800 ml de agua destilada. Añadir 203 mg de  $MgCl_2$ . Ajustar a pH 7.5 con HCl 2 N.

Para solubilizar el inhibidor de proteasas añadir a 348.4 mg de PMSF, 10 ml de alcohol isopropílico y sumergirlo en un baño

de agua hirviendo. Colocar en el mismo baño la solución Tris-MgCl<sub>2</sub> y agregarle la de PMSF cuando ambas tengan temperatura similar. Dejar que enfríe a temperatura ambiente. Aforar a 1,000 ml con agua destilada.

- e. Manitol 0.5 M en amortiguador TRIS.
- f. Sacarosa 0.58 M en amortiguador TRIS.
- g. Sacarosa 20% en amortiguador TRIS.
- h. Alfa metil manósido 1 M en amortiguador TRIS.

#### Procedimiento.

Todos los pasos de aislamiento de membranas se realizan en baño de hielo y con centrifuga refrigerada, a 4 °C.

- Lavar las amibas tres veces con PBS 0.15 M pH 7.2 y dos veces con PBS-MgCl<sub>2</sub>, mediante centrifugación a 1,500 rpm durante 5 minutos. De esta forma se consigue eliminar los constituyentes del medio de cultivo (17).

- Resuspender el paquete amibiano en PBS-MgCl<sub>2</sub>, de tal forma que la concentración sea de 4 a 6 x 10<sup>7</sup> células/ml.

- Determinar la viabilidad celular mediante la exclusión del colorante azul de tripán 1%.

- Añadir rápidamente un volumen igual de la solución de con canavalina A 1 mg/ml. Reposar la mezcla durante 5 minutos.

- Lavar dos veces con PBS-MgCl<sub>2</sub>, centrifugando a 750 rpm durante 2 minutos, con el fin de eliminar el exceso de Con A. Descartar el sobrenadante.

- Resuspender el paquete celular en 12 ml de amortiguador TRIS, e incubar 10 minutos en este amortiguador hipotónico, con el proposito de favorecer el hinchamiento celular. Homogeneizar con un homogeneizador de cristal Dounce de vástago delgado, mediante 30 compresiones.

- Verificar por microscopía la lisis celular y la formación de capas de membrana. Tomar una alícuota como control.

- Depositar el homogeneizado sobre un gradiente de dos pasos formado por 8 ml de manitol 0.5 M sobre 4 ml de sacarosa 0.58 M. Centrifugar 30 minutos a 750 rpm. Separar con pipeta Pasteur el sobrenadante y etiquetarlo como sobrenadante I ,

mientras que el sedimento del fondo del tubo corresponde al precipitado I.

- Centrifugar el sobrenadante I a 24,000 rpm durante 60 minutos. Separar el sobrenadante II, el cual contiene los complejos solubles (CS), mientras que el precipitado II esta constituido por las membranas internas (MI).

- Resuspender el precipitado I en 1 ml de TRIS-alfametilmannósido 1 M, e incubar 40 minutos con agitación ocasional, para liberar las membranas plasmáticas de la Con A.

- Diluir con tres volúmenes de amortiguador TRIS y homogeneizar mediante 80 compresiones del vástago.

- Depositar el homogeneizado sobre 4 ml de sacarosa 20% y centrifugar a 750 rpm por 30 minutos, para obtener el sobrenadante III y el precipitado III que contiene las membranas no vesiculadas y restos celulares (MNV).

- Centrifugar el sobrenadante III a 24,000 rpm por 60 minutos. Eliminar el sobrenadante IV y recuperar el precipitado IV constituido por las membranas plasmáticas (MP).

### 3. SOLUBILIZACION DE GLICOPROTEINAS.

En vista de que las proteínas de membrana son muy insolubles en sistemas acuosos neutros fue necesario emplear un amortiguador de fuerza iónica alta, a fin de extraer las proteínas glicosolubles de membrana (9, 28).

#### Soluciones.

a. Amortiguador de rompimiento: Tris 50 mM + KCl 50 mM +  $(\text{CH}_3\text{COO}_2)\text{Mg}$  5 mM.

Disolver 606 mg de Tris, 372.8 mg de KCl y 68 mg de acetato de magnesio en 90 ml de agua destilada. Ajustar a pH 7.6 con HCl 1 N y aforar a 100 ml.

#### Procedimiento.

- Resuspender las fracciones membranales obtenidas por el método de Aley (membranas internas, membranas no vesiculadas y membranas plasmáticas) en 2 a 3 ml de amortiguador de rompimiento. Homogeneizar y dejar en reposo toda la noche a 4 °C.



- Centrifugar a 3,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Recuperar el sobrenadante, el cual contiene los compuestos glicosolubles de membrana. Resuspende 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.

#### 4. DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY.

Es una modificación del método Folin-ciocalteu, basado en la determinación del triptófano y la tirosina contenidos en las proteínas, ya que en presencia de cobre son capaces de reducir el reactivo de Folin-ciocalteu formando un complejo de color azul. Sin embargo, debido a que la cantidad de estos aminoácidos varía en las diferentes proteínas se requiere una curva de referencia (31).

Soluciones.

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 salina 0.85%.

b. Reactivo B.

Esta formado por tres soluciones que se deben mezclar hasta el momento de utilizarse, ya que el reactivo B 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 10 ml de agua destilada.

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

Reactivo B: mezclar 1 ml de tartrato de sodio y potasio con 1 ml de sulfato de cobre, y añadir 100 ml de carbonato de sodio.

c. Reactivo de Folin.

Mezclar 5 ml del reactivo de Folin-ciocalteu con 5 ml de agua destilada. Prepararlo al momento de usar.

Procedimiento.

4.1. Elaboración de la curva patrón.



- Preparar los tubos de ensaye por duplicado, de la siguiente manera:

No. Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
( $\mu$ g protefna)	-	10	20	50	100	150	200	250
estandar (ml)	-	.01	.02	.05	.10	.15	.20	.25
NaCl 0.85% (ml)	.40	.39	.38	.35	.30	.25	.20	.15

- Añadir a cada tubo 2 ml del reactivo B. Mezclar bien, y dejar reposar 10 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 obscuridad. Medir espectrofotométricamente la absorbancia a 500 nm, empleando el tubo 1 como blanco.

- Construir la curva de calibración con los valores de absorbancia a 500 nm vs  $\mu$ g de protefna.

#### 4.2. Muestras problema.

Las muestras problema se tratan de igual forma que las muestras de la protefna de referencia, también deben incluirse tubos blanco. Se puede poner 0.1 ml de muestra, mas 0.3 ml de solución salina 0.85%, y en caso de que el valor de absorbancia no este comprendido en la curva patrón, probar diluciones mayores o menores según se requiera. Lo importante es que la muestra diluída tenga un volumen de 0.4 ml, para conservar la proporción del resto de los reactivos.

- Determinar sobre la curva de calibración los  $\mu$ g de protefna presente en el tubo, en función de su absorbancia.

- Calcular los  $\mu$ g de protefna/ml con base en la cantidad de muestra que se puso inicialmente en el tubo.

### 5. DETERMINACION DE AZUCARES POR EL METODO FENOL-SULFURICO.

El método colorimétrico Fenol-ácido sulfúrico permite cuantificar azúcares totales y el contenido de azúcares en glicoproteínas, debido a que la unión del reactivo con los residuos del azúcar forma un complejo de color naranja (13).

Soluciones.

a. Azúcar de referencia, 1 mg/ml.

Se empleó como estandar 10 mg de glucosa disuelta en 10 ml de agua destilada.

b. Solución acuosa de fenol al 5%.

c. Acido sulfúrico concentrado.

Procedimiento.

- En tubos de ensaye, perfectamente lavados con detergente, colocar por duplicado cantidades crecientes de glucosa, y ajustar el volumen con agua destilada a 0.5 ml/tubo.

No. Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
( $\mu$ g azúcar)	-	5	10	20	30	40	50	100
estandar (ml)	-	.005	.01	.02	.03	.04	.05	.10
agua (ml)	.500	.495	.49	.48	.47	.46	.45	.40

- Agregar a cada tubo 0.3 ml de fenol 5%, y colocarlos en un baño de hielo.

- Añadir a cada tubo 1.8 ml de ácido sulfúrico concentrado, depositando el ácido en el centro del líquido. Mezclar de inmediato vigorosamente.

- Una vez que los tubos estén a temperatura ambiente, medir la absorbancia a 480 nm. En este caso se empleó un espectrofotómetro Zeiss PMQ II. Construir la curva de calibración graficando los valores de absorbancia vs  $\mu$ g de azúcar.

- Las muestras problema 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  $\mu$ g de azúcar/ml con base en el volumen de muestra empleado.

## 6. DETERMINACION DE PESO SECO POR EVAPORACION.

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

Procedimiento.

- Lavar perfectamente varios vidrios de reloj y colocarlos en una estufa a temperatura constante de 100 °C.

- Verificar diariamente el peso seco de cada vidrio de re-

loj, en balanza analítica, hasta obtener peso constante. Antes de pesar los vidrios se dejan enfriar dentro de una cámara desecadora parcialmente abierta.

- Previamente debe realizarse una diálisis exhaustiva de las muestras, con solución salina 0.9%.

- Colocar una alícuota de cada muestra en un vidrio de reloj y dejarla secar totalmente a 100 °C.

- Registrar el peso de cada vidrio y obtener la diferencia respecto a su peso inicial. Dicha diferencia corresponde al peso seco de la muestra.

- Calcular el peso seco de la muestra total extrapolando en función del volumen de la alícuota empleada.

#### 7. PORCENTAJE DE CADA FRACCION CELULAR DE E. histolytica.

Por el método de Lowry se determinaron proteínas al homogeneizado de amiba y a las cuatro fracciones (CS, MI, MNV y MP) obtenidas por el método de Aley, con el fin de cuantificar el porcentaje que se obtiene de cada una a partir de un determinado número de células. Se consideró como 100% la cantidad de proteína presente en el homogeneizado amibiano, y con base en ello se calculó el porcentaje correspondiente a cada fracción y el porcentaje de recuperación de proteína. Esto se realizó 4 veces con diferentes lotes de amibas y se obtuvo el promedio.

Así mismo, empleando un lote de  $150 \times 10^6$  amibas se determinó el porcentaje de peso seco de las fracciones celulares.

Además, por el método Fenol-ácido sulfúrico se cuantificaron los azúcares de cada fracción y se calculó la relación proteína/carbohidrato.

#### 8. PURIFICACION DE ANTIGENOS DE COMPLEJOS SOLUBLES.

Se emplearon dos tipos de muestra:

- Liofilizada. Complejos solubles obtenidos de un buen número de aislamientos se reunieron y liofilizaron, material que posteriormente se resuspendió en amortiguador de fosfatos 10 mM y se fraccionó por filtración el gel.

- Muestra fresca. La fracción de complejos solubles recién aislada, por el método de Aley, se dializó exhaustivamente vs solución salina normal y se procedió a precipitar por salado, para su posterior filtración en gel.

### 8.1. FILTRACION EN GEL DEL MATERIAL LIOFILIZADO.

En la filtración en gel una mezcla de moléculas se deja fluir por gravedad a lo largo de una columna empacada con perlas porosas de un polímero inerte, de elevado grado de hidratación. La separación de los componentes dependerá de la capacidad diferencial de las moléculas para penetrar los poros de las perlas. Las moléculas muy pequeñas penetran en los poros y por consiguiente se mueven lentamente, mientras que las mayores se moverán a través de la columna cromatográfica con mayor rapidez. Por lo tanto, las moléculas son eluidas en orden de tamaño molecular decreciente (16, 29, 42).

Procedimiento.

#### 8.1a. Preparación del soporte.

- Hidratar el Sephadex en agua destilada durante 1 a 3 días dependiendo del tipo de gel. Lavarlo con el amortiguador que se utilizará como eluyente, realizando el número de cambios necesarios hasta alcanzar su pH.

- Dejar el gel en la cantidad de eluyente adecuada para obtener una suspensión homogénea y densa. Deaerear mediante el empleo de vacío.

- Colocar la columna en posición vertical y verter la suspensión del gel por la pared. Todo el gel requerido debe empacarse en una sola operación.

- Abrir la salida de la columna e iniciar el flujo. Equilibrar el gel pasando 2 ó 3 veces el volumen de la columna con el eluyente.

- Calcular el volumen de la cama de Sephadex. Calcular el tamaño de muestra: 3 a 5% del volumen total del gel.

- Verificar el empacamiento, observando el paso homogéneo a través de la columna de una muestra de Azul Dextran 2,000 al

0.2%, con lo que simultaneamente puede determinarse el volumen de vacio.

#### 8.1b. Experimentos realizados.

- Con el fin de separar las proteínas contenidas en los complejos solubles se emplearon tres tipos de Sephadex: G-75, G-100 y G-200, cuyos límites de exclusión de proteínas son 80,000, 100,000 y 600,000 daltones, respectivamente.

- Como eluyente se utilizó amortiguador de fosfato de sodio 10 mM pH 8.0, el cual se prepara añadiendo a una solución de fosfato de sodio dibásico 10 mM la cantidad necesaria de fosfato de sodio monobásico 10 mM, para ajustar el pH a 8.0.

- Para comparar los perfiles de elución en los tres tipos de Sephadex se realizaron los corrimientos bajo las mismas condiciones, y con las siguientes características:

Dimensiones de la columna: 7.5 x 1.8 cm, 19 ml de volumen total y 6.5 ml de volumen de vacio.

Muestra: 25 mg de complejos solubles liofilizados, conteniendo 2.5 mg de proteína, resuspendidos en 0.95 ml de eluyente.

- Se colectaron 35 fracciones de 1 ml y se midió la absorbancia a 280 nm, en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II. Se graficó la absorbancia vs volumen de elución.

## 8.2. PRECIPITACION FRACCIONADA Y FILTRACION EN GEL DEL MATERIAL RECIEN AISLADO.

### 8.2a. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio.

La precipitación es un método útil para la separación de mezclas de proteínas. Consiste en añadir progresivamente una sal, hasta alcanzar una fuerza iónica lo suficientemente elevada para que una proteína precipite de la solución, sin perder su conformación nativa. La concentración elevada de la sal elimina el agua de hidratación de las moléculas proteicas reduciendo considerablemente su solubilidad. El sulfato de amonio se emplea frecuentemente para purificar proteínas por precipitación debido a que su gran solubilidad en agua permite alcanzar fuerzas iónicas muy elevadas (29).

### Procedimiento.

La mezcla dializada de los complejos solubles obtenidos en tres aislamientos se precipitó fraccionadamente como se indica en los siguientes pasos:

- Agregar lentamente sulfato de amonio, hasta alcanzar una saturación del 0-33%, considerando que para precipitar al 33% una solución se requieren 188 g/l. Mantener en reposo toda la noche a fin de tener la seguridad de que hay una completa floculación.

- Centrifugar 30 minutos a 3,000 rpm a 4 °C. Resuspender el precipitado en 1 a 2 ml de solución salina 0.9%.

- Precipitar el sobrenadante al 33-80%. De tablas se obtiene que para pasar de 33 a 80% de saturación se requieren 333 g/l. Dejar reposar toda la noche. Centrifugar a 4 °C durante 30 minutos a 3,000 rpm y resuspender el precipitado en solución salina 0.9%.

- Precipitar el sobrenadante al 80-100%, considerando que para obtener un cambio de 80 a 100% se requieren 157 g/l. Dejar reposar toda la noche.

- Centrifugar a 3,000 rpm durante 30 minutos. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 2 ml de solución salina 0.9%.

- Eliminar el sulfato de amonio dializando exhaustivamente los precipitados contra solución salina 0.9% , hasta obtener una prueba de cloruro de bario negativa. Para esta prueba basta mezclar 1 ml de cloruro de bario 1% con 1 ml del líquido de diálisis, si la mezcla se enturbia indica que aún hay sulfato de amonio y el sulfato de bario precipita, dando una prueba positiva.

- Centrifugar los dializados 15 minutos a 1,000 rpm, Recuperar los sobrenadantes y desechar los sedimentos, que corresponden a proteína desnaturizada.

#### 8.2b. Filtración en gel del material precipitado.

El precipitado obtenido de 33-80% de saturación fue fraccionado por cromatografía de exclusión molecular en un soporte de

Sephadex G-100 superfino, bajo las siguientes condiciones:

- Dimensiones del soporte: 18 x 1.59 cm, volumen total de 36 ml y volumen de vacío de 12 ml.

- La columna se equilibró previamente con amortiguador de fosfato de sodio 10 mM pH 8.0, mismo que se utilizó como eluyente.

- El corrimiento se realizó cuatro veces, se aplicó en cada ocasión 1.8 ml del material precipitado al 80%, conteniendo 14.2 mg de proteína.

- Se colectaron 20 fracciones de 2 ml y se midió la absorbancia a 280 nm, en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II.

- Con base en la curva obtenida al graficar la absorbancia vs volumen eluido, se reunieron los tubos correspondientes a cada pico. Así mismo, se reunieron los picos similares de los diferentes corrimientos.

- Posteriormente el primer pico (Pico A) se concentró por precipitación con sulfato de amonio al 100%, y se recromatógrafa bajo las mismas condiciones, a fin de purificarlo.

#### 8.2c. Recuperación del Pico A.

Se determinó proteínas por el método de Lowry a la mezcla original de complejos solubles y a las fracciones precipitadas, así como a los diferentes picos obtenidos por cromatografía, con el fin de cuantificar el porcentaje de proteína que se obtiene en el Pico A a partir de una determinada cantidad de proteína amibiana total.

#### 9. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

La electroforesis en gel de poliacrilamida permite el análisis y separación de mezclas de proteínas, y es un excelente método dada la transparencia del gel, su alta resolución y reproducibilidad. La separación en la electroforesis convencional, PAGE, depende de la carga, tamaño y forma de las moléculas. Es posible separar diferentes intervalos de peso molecular al variar la concentración del gel.

En la electroforesis desnaturizante, SDS-PAGE, las proteí

nas se someten a la acción del 2-mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuro y simultaneamente se tratan con el detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS) que recubre las cadenas y las carga negativamente. Así, la separación únicamente depende del tamaño y es posible determinar el peso molecular de las muestras comparando su movilidad con la de marcadores de peso molecular conocido (16, 27, 29, 48).

#### Soluciones.

##### a. Acrilamida-bis 30%:0.8.

Disolver 30 g de acrilamida y 0.8 g de N,N'metilenobisacrilamida en agua destilada y aforar a 100 ml. Filtrar con papel de filtración rápida. Almacenar a 4 °C en frasco ambar.

##### b. Tris-HCl 1.5 M pH 8.8.

Disolver 18.15 g de Tris en 50 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl 2 N. Aforar a 100 ml.

##### c. Tris-HCl 0.5 M pH 6.8.

##### d. Solución acuosa de SDS al 10% (p/v).

##### e. N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED).

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

##### g. Amortiguador de muestra.

Mezclar 10 ml de Tris-HCl pH 6.8, 10 ml de glicerol, 2 ml de azul de bromofenol 0.1% y 28 ml de agua destilada. En el caso de SDS-PAGE agregar 1 g de SDS y 1 ml de 2-mercaptoetanol.

##### h. Amortiguador de corrimiento.

Disolver por separado 15 g de Tris y 72 g de glicina. Mezclar las soluciones y aforar a 5 litros con agua destilada. Verificar que el pH sea 8.3. Para SDS-PAGE añadir 5 g de SDS.

##### i. Solución fijadora.

A 400 ml de metanol agregar 70 ml de ácido acético y 530 ml de agua destilada. Guardar en un frasco ambar.

##### j. Solución teñidora.

Disolver 2.5 g de azul brillante de Coomassie en 908 ml de metanol al 50%. Añadir 92 ml de ácido acético. Agitar durante 30 minutos. Filtrar.

##### k. Solución desteñidora.



A 450 ml de metanol agregar 300 ml de ácido acético y aforar a 3,000 ml con agua destilada.

1. Solución preservadora.

A 150 ml de metanol añadir 100 ml de ácido acético, 100 ml de glicerol y 650 ml de agua destilada.

m. Gel de separación, concentración 11.5%.

Mezclar 11.5 ml de acrilamida-bis 30%:0.8, 7.5 ml de Tris-HCl pH 8.0 y 10.55 ml de agua destilada. Deaerear con vacío durante 3 a 5 minutos. Añadir 10  $\mu$ l de TEMED y 0.05 ml de APS 10%. Para SDS-PAGE añadir 0.06 ml de SDS 10%. Mezclar suavemente y aplicar de inmediato a las placas.

n. Gel de introducción.

Mezclar 2.5 ml de acrilamida-bis 30%:0.8, 3.75 ml de Tris-HCl pH 6.8 y 8.55 ml de agua destilada. Deaerear y agregar 7.5  $\mu$ l de TEMED y 0.05 ml de APS 10%. Para SDS-PAGE añadir 0.15 ml de SDS 10%. Mezclar suavemente y aplicar de inmediato.

Procedimiento.

Se empleo el equipo de electroforesis vertical LKB 2001.

9.1. Preparación del gel.

- Colocar las placas de vidrio en su base y verificar que los bordes estén perfectamente sellados. Las dimensiones de las placas utilizadas son 180 x 160 x 3 mm y los separadores tienen un grosor de 1.5 mm.

- Nivelar la base sobre una superficie plana. Aplicar el gel de separación entre las placas de vidrio, hasta una altura de 12.5 cm. En el espacio restante estratificar agua destilada para evitar que se deshidrate el gel y facilitar que polimerice horizontalmente. Dejar reposar dos horas.

- 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 durante una hora.

- Retirar el peine y colocar la cámara superior, sellar perfectamente. Poner en la cámara el amortiguador de corrimiento

correspondiente (PAGE o SDS-PAGE).

#### 9.2. Preparación de las muestras proteicas.

- PAGE convencional. La muestra, bien solubilizada en un amortiguador, se mezcla volumen a volumen con el amortiguador de muestra y se aplica. El volumen depende de la concentración de la muestra, basta con aplicar 15 µg de proteína.

- SDS-PAGE. Depositar las muestras en tubos de ensayo de 13 x 100 mm y mezclarlas volumen a volumen con el amortiguador de muestra SDS-PAGE. Colocar los tubos en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y aplicar.

- Marcadores. En SDS-PAGE deben incluirse marcadores de peso molecular conocido. Disolverlos en amortiguador de muestra SDS-PAGE y colocarlos en un baño de agua hirviendo durante un minuto. Aplicar 15 µl.

#### 9.3. Electroforesis.

- Depositar 2 litros de amortiguador de corrimiento (PAGE o SDS-PAGE) en la cámara inferior y colocar dentro el refrigerante y las placas con la cámara superior. Tapar.

- Conectar a un baño de agua recirculante, a 12 °C.

- Conectar el sistema a una fuente de poder de corriente constante, mantener 30 mA/placa, durante 5 hr, hasta que el frente, observable en el azul de bromofenol, llegue a 1 cm por arriba del límite inferior del gel.

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

#### 9.4. Tinción proteica y preservación del gel.

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

- Eliminar la solución fijadora y tratar el gel durante 2 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.

- Con una navaja separar el gel de introducción.

- Es conveniente tratar durante 1 a 3 hr con solución pre-

servadora los geles con concentración mayor al 10%, para evitar el riesgo de rompimiento al secarlos.

- Determinar la movilidad relativa de cada banda.

- Colocar el gel en un papel filtro grueso y ponerlo en un Secador de Geles para lograr su deshidratación.

#### 9.5. Determinación del peso molecular (48).

- Para este cálculo es necesario construir una curva de calibración graficando la movilidad relativa ( $R_f$ ) de los marcados contra sus pesos moleculares, en papel milimétrico o semi logarítmico. La movilidad relativa de una proteína se calcula dividiendo su distancia de migración desde el inicio del gel separador hasta el centro de la banda peptídica, entre la distancia recorrida por el azul de bromofenol.

$$R_f = \frac{\text{distancia de migración del péptido}}{\text{distancia de migración del frente}}$$

- Se calcula la movilidad relativa de cada uno de los pépti dos desconocidos corridos en SDS-PAGE; su peso molecular se interpola en la curva.

### 10. REACCIONES INMUNOLOGICAS.

#### 10.1. OBTENCION DE ANTISUERO DE CONEJO (18).

Con el fin de obtener anticuerpos específicos, se procedió a inocular conejos con complejos solubles.

- Antígeno: se prepararon vacunas con complejos solubles liofilizados, resuspendidos en solución salina normal y emulsi ficados con adyuvante completo de Freud, a fin de aumentar su antigenicidad.

- 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 proteí nas de complejos solubles.

- Suero: la sangre se obtuvo por punción de la vena marginal de la oreja. Se dejó reposar 2 hr a temperatura ambiente, se desprendió el coágulo y se mantuvo en refrigeración para fa

vorecer su contracción. Después, se separó el suero con pipeta Pasteur, se depositó en viales con azida de sodio y se almacenó a  $-40^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso.

## 10.2. DOBLE INMUNODIFUSION.

Esta técnica involucra reacciones de precipitación entre el antígeno y el anticuerpo, al difundir ambos en una capa semisólida, formando bandas de precipitación en la zona donde sus concentraciones son óptimas (18).

Se realizó doble inmunodifusión de las fracciones de complejos solubles, así como de las fracciones celulares del trofozoito frente al suero de conejo anti-CS y suero de paciente.

Soluciones.

a. Agar 1.5%.

Disolver perfectamente por calentamiento 1.5 g de agar en 100 ml de solución salina normal. Añadir azida de sodio.

b. Solución preservadora.

Mezclar 10 ml de glicerol con 90 ml solución salina 0.85%

c. Solución teñidora y desteñidora.

Disolver 500 mg del colorante amido negro en 100 ml ácido acético al 5% y filtrar. Decolorante: ácido acético al 3%.

Procedimiento.

- 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 de agar 1.5% caliente. Dejar solidificar.

- Perforar en el gel el número de pozos necesarios de acuerdo a la cantidad de muestras. Llenar los pozos con los antígenos y antisueros, emplear 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 colo-

ca la placa en un recipiente con solución salina 0.3 M, realizando varios cambios con solución salina 0.85% por un periodo de 2 a 5 días.

- Mantener la placa en solución preservadora un día.
- Retirar la placa de la solución y colocar sobre el gel una pieza de papel filtro del mismo tamaño y 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.

### 10.3. INMUNOELECTROFORESIS.

La inmunolectroforesis se basa en dos propiedades: la movilidad característica de las proteínas en un campo eléctrico (electroforesis) que permite su separación de acuerdo a su carga neta, y la capacidad del antígeno y anticuerpo específicos de precipitar en un gel (inmunodifusión), (18).

Esta técnica se empleó para analizar las fracciones de complejos solubles frente al antisuero de conejo.

Soluciones.

- a. Amortiguador barbital pH 8.6,  $\mu=0.05$  (Sigma de México).
- b. Agarosa (Sigma Chemical Co.) 1%.

Disolver 1 g de agarosa en 100 ml de barbital, mediante calentamiento con agitación constante. Añadir azida de sodio.

Procedimiento.

- Colocar las placas de 25 x 75 mm en una superficie plana y nivelada y distribuir uniformemente con una pipeta serológica 3 ml de la solución caliente de agarosa 1%.
- Dejar solidificar y realizar sobre el gel las perforaciones adecuadas. Llenar el pozo con el antígeno.
- Llenar la cámara de electroforesis con amortiguador barbital, cuidando que el nivel sea igual en ambos compartimientos.

- Poner la placa en la cámara, colocar en pozo con la muestra cercano al electródo negativo, y poner en contacto el gel con el amortiguador por medio de puentes de papel.

- Conectar la fuente de poder y aplicar de 8 a 10 volts/cm durante 2 hr. Una vez terminada la separación desconectar el sistema y retirar la placa.

- Con una navaja hacer un canal longitudinal en el gel, retirar la agarosa y llenarlo con el antisuero específico.

- Colocar la placa dentro de una cámara húmeda, a temperatura ambiente y permitir el desarrollo de las bandas de precipitación durante 24 a 48 hr.

- Lavar, secar y teñir el gel por medio del procedimiento descrito para doble inmunodifusión.

#### 10.4. DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIAMIBA POR HEMAGLUTINACION PASIVA.

La hemaglutinación pasiva es. una técnica muy sensible que permite detectar pequeñas cantidades de anticuerpo. Los eritrocitos de carnero al tratarse con una solución diluída de ácido tánico adquieren la propiedad de adsorber protefina, y una vez revestidos con ella son aglutinables por el antisuero específico dirigido contra la proteína adsorbida (18, 21).

Mediante la técnica de hemaglutinación pasiva con eritrocitos tanizados se titularon el suero de conejo anti-complejos solubles y los sueros de paciente con amibiasis intestinal o absceso hepático amibiano, sensibilizando los eritrocitos con antígeno total de E. histolytica (HM1:IMSS).

##### Soluciones.

a. Amortiguador de fosfatos salino (PBS) pH 7.2.

A 100 ml de salina normal añadir 24 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15 M y 76 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.15 M. Mezclar y ajustar el pH si es necesario.

b. Amortiguador de fosfatos salino (PBS) pH 6.4.

Mezclar 100 ml de salina normal, 32.2 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.15 M y 67.8 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15 M. Ajustar el pH si se requiere.

c. Diluyente: PBS-SN pH 7.2.

Inactivar suero normal de conejo por calentamiento a 56 °C durante 30 minutos. Preparar una solución de suero normal inactivo al 3% en PBS pH 7.2.

d. Anticoagulante de Alsever.

Disolver 2.5 g de dextrosa, 0.8 g de citrato de sodio (dihidratado), 55 mg de ácido cítrico (monohidratado) y 420 mg de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada. Esterilizar 15 minutos a 121 °C.

e. Eritrocitos de carnero.

Mezclar la sangre de carnero con un volumen igual de anticoagulante de Alsever, y guardar a 4 °C. Se emplean los eritrocitos de 8 a 21 días de almacenaje, pero deberán descartarse antes si presentan hemólisis.

f. Ácido tánico (1:100,000).

Preparar una solución 1:1,000 disolviendo 100 mg de ácido tánico en 100 ml de agua destilada. Guardar en refrigeración y descartar después de dos semanas o antes si presenta precipitado. Al momento de utilizarse se hace una solución 1:100,000 diluyendo 1 ml en 100 ml de PBS pH 7.2.

g. Antígeno total.

Lavar los trofozoítos 5 veces con PBS pH 7.2. Romper las células por congelación a -40 °C y descongelación a 37 °C alternadas, y homogeneizar. Titular la concentración óptima.

h. Antisuero.

Inactivar el complemento por calentamiento a 56 °C durante 30 minutos.

Procedimiento.

- Lavar los eritrocitos cinco veces con PBS pH 7.2 frío, centrifugando a 3,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Resuspender 3 ml del paquete celular en 97 ml de PBS pH 7.2.

- Preparar la solución de ácido tánico 1:100,000 y mantenerla en un baño de hielo.

- Mezclar 2 ml de la suspensión de eritrocitos 3% con 2 ml de ácido tánico diluido y mantener en un baño de hielo durante 15 minutos. Agitar por inversión cada 5 minutos.

- Lavar las células con PBS pH 7.2 y resuspender en 2 ml de solución salina isotónica.

- Depositar los eritrocitos tanizados en un tubo que contenga 2 ml del antígeno diluido con PBS pH 6.4, a su reactividad óptima determinada previamente por titulación. Incubar a 37 °C durante 15 minutos, mezclar por inversión cada 5 minutos.

- Lavar los eritrocitos dos veces con PBS-SN pH 7.2 y resuspenderlos en 6 ml de este diluyente.

- En una placa de microtitulación hacer diluciones seriadas del antisuero con PBS-SN pH 7.2, dejar 25  $\mu$ l de la dilución en cada pozo.

- Controles: es conveniente correr dos controles positivos, uno de título alto y otro bajo. Incluir un suero negativo. Poner un pozo con PBS-SN para asegurarse que las células sensibilizadas presentan un patrón negativo para dicho diluyente.

- Añadir 25  $\mu$ l de los eritrocitos sensibilizados a cada pozo. Cubrir la placa y agitar suavemente.

- Leer resultados después de 1 hr. El título se registra como el recíproco de la mayor dilución del suero a la que se observa aglutinación de los eritrocitos.



## IV. RESULTADOS.

## 1. AISLAMIENTO.

La viabilidad de los trofozoítos de E. histolytica fue superior al 95% en todos los aislamientos de membranas realizados. La tabla I muestra el porcentaje promedio de proteína de cada fracción amibiana, separada por el método de Aley, así como el porcentaje de peso seco de las mismas. La recuperación de proteínas en las fracciones celulares fue de 90.5 a 97.8%, considerando como 100% la proteína presente en el homogeneizado total, con valores de 1.08 a 1.2 mg de proteína total por millón de amibas.

En la tabla II observamos que el contenido de azúcares es mayor en membranas no vesiculadas y menor en membranas plasmáticas. No obstante, la relación carbohidrato/proteína es considerablemente mayor en las fracciones membranales (MI, MNV y MP) que en complejos solubles.

Tabla I. Proporción de las fracciones celulares de Entamoeba histolytica.

FRACCION	% PROTEINA	% PESO SECO
Complejos solubles	60.97	62.28
Membranas internas	14.67	28.11
Memb. no vesiculadas	16.79	7.18
Memb. plasmáticas	2.61	2.42

Tabla II. Contenido de azúcares en las fracciones de Entamoeba histolytica ( $60 \times 10^6$  trofozoítos).

FRACCION	mg AZUCAR	mg PROTEINA	AZUCAR/PROTEINA
Complejos solubles	2.51	41.72	0.06
Membranas internas	2.58	9.3	0.27
Memb. no vesiculadas	3.33	12.6	0.26
Memb. plasmáticas	0.24	2.2	0.11

## 2. PURIFICACION.

Al realizar la filtración en gel de los complejos solubles liofilizados se obtuvo en los tres corrimientos un primer pico bien definido, que sale con el volumen de exclusión indicando la presencia de una proteína de alto peso molecular. Además se observan una serie de picos imbrincados: cuatro en Sephadex G-75 (fig. 1), siete en G-100 (fig. 2) y siete en G-200 (fig. 3). El perfil para los tres soportes es similar, si bien en ninguno de los casos se logró una buena resolución.

La filtración en Sephadex G-100 de los complejos solubles precipitados al 80% de saturación (CS 80%) muestra dos picos (A y B) no bien separados (fig. 4). La filtración posterior en el mismo soporte, del Pico A proporciona un solo pico muy bien definido (fig. 5).

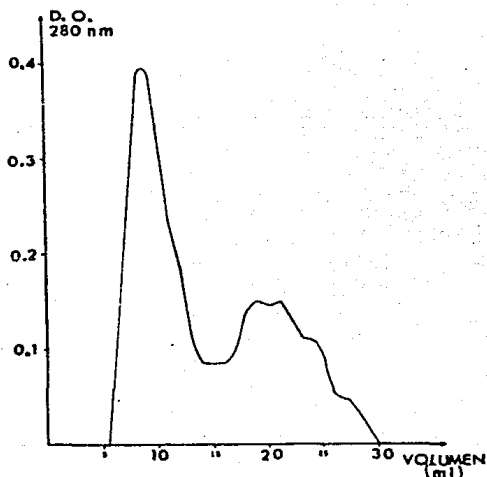


Figura 1. Cromatografía de Complejos Solubles de E. histolytica (HMI:IMSS) en Sephadex G-75.

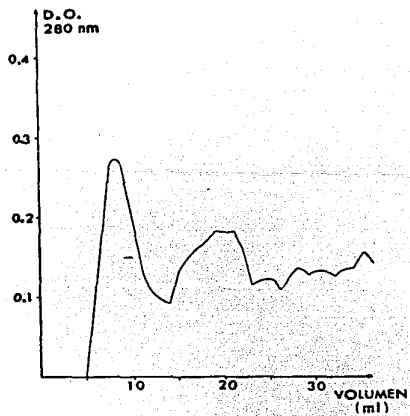


Figura 2. Cromatografía de Complejos Solubles en Sephadex G-100.

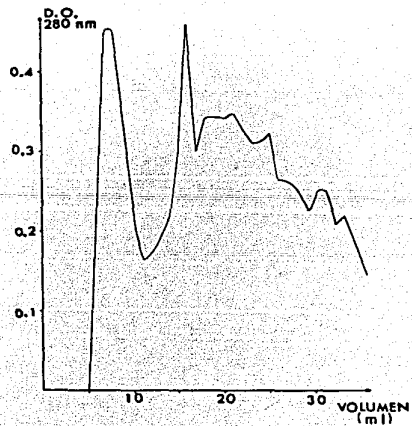


Figura 3. Cromatografía de Complejos Solubles en Sephadex G-200.

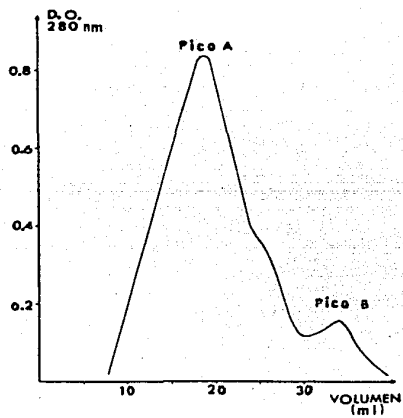


Figura 4. Cromatografía en Sephadex G-100 de Complejos Solubles 80%.

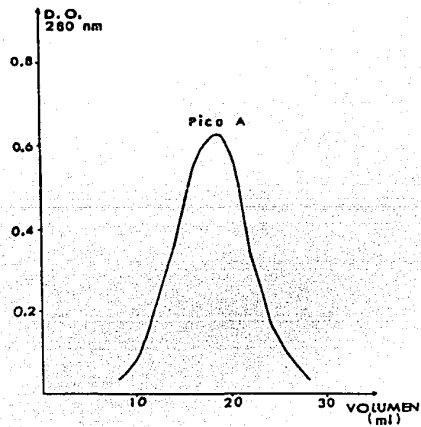
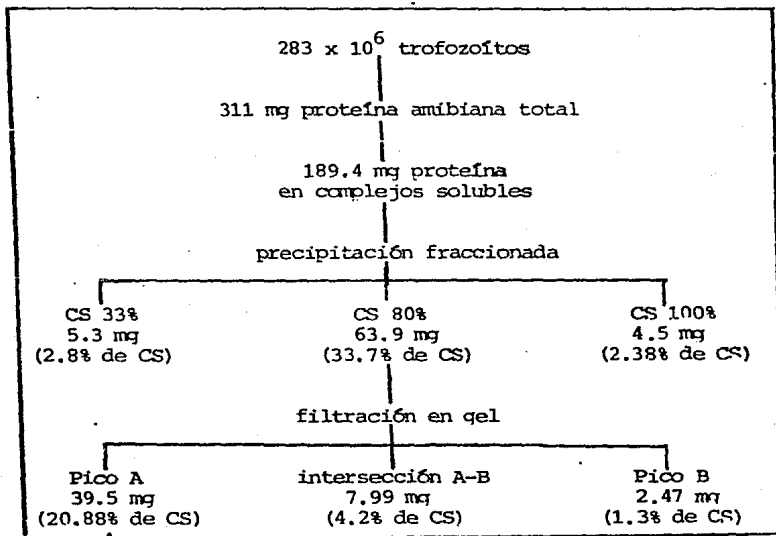


Figura 5. Cromatografía en Sephadex G-100 del Pico A de CS 80%.

Los valores de la tabla III muestran el porcentaje de proteína, determinado por el método de Lowry, del Pico A de CS 80%. Durante la precipitación fraccionada al 33, 80 y 100% de saturación únicamente se recuperó el 38.88% de la proteína inicial de CS, ya que durante la diálisis hubo desnaturalización. En el Pico A se recupera por lo menos el 20.88% de la proteína de CS, equivalente al 12.7% de la proteína ambiental total y a 0.14 mg de proteína del Pico A por millón de amibas.

La figura 6 muestra la electroforesis convencional en gel de poliacrilamida de las fracciones celulares del trofozoito, de las fracciones de CS precipitadas con sulfato de amonio y de los picos obtenidos por filtración en gel de CS 80%. El Pico A presenta cuatro bandas, sin embargo se encuentra una

Tabla III. Rendimiento del Pico A de Complejos Solubles 80%.



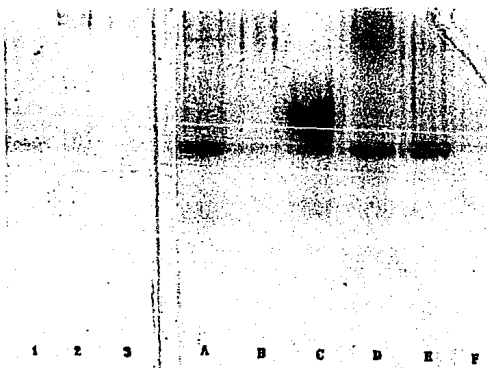


Figura 6. PAGE-conventional de las fracciones celulares del trofozoito de *E. histolytica* y de las fracciones de Complejos Solubles.

1, membranas Internas (7); 2, membranas no vesiculadas (7); 3, membranas plasmáticas (5); A, complejos solubles (10); B, complejos solubles 33% (4); C, complejos solubles 100% (7); D, complejos solubles 80% (5); E, pico A (4); F, pico B (6). Entre paréntesis se indica el número de bandas.

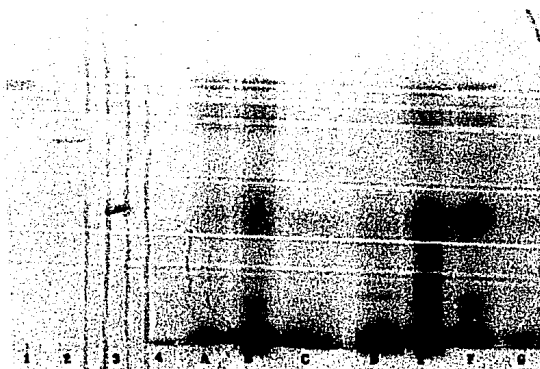


Figura 7. SDS-PAGE de las fracciones de Complejos Solubles.

A, antígeno ambigiano total; B, complejos solubles; C, complejos solubles 33%; D, complejos solubles 100%; E, complejos solubles 80%; F, pico A; G, pico B. Marcadores de peso molecular: 1, albúmina bovina, 66,000; 2, albúmina de huevo, 45,000; 3, anhidrasa carbónica, 29,000; 4, lactalbúmina, 14,200.

Tabla IV. SDS-PAGE de las fracciones de Complejos Solubles.

FRACCION	PESO MOLECULAR DE LOS PEPTIDOS			
Antígeno total	90,200	75,000	70,000	67,000
	57,500	53,000	50,100	42,600
	36,300	33,500	28,800	26,600
	19,500	17,400	14,200	12,000
Complejos solubles	67,000	57,500	53,000	42,600
	36,300	33,500	29,800	26,600
	19,500	17,400	14,200	12,000
Compl. sol. 33%	28,200	19,500	14,600	
Compl. sol. 100%	33,500	26,600	17,400	14,200
Compl. sol. 80%	67,000	57,500	53,000	42,600
	29,800	26,600	19,500	17,400
	14,200	12,000		
Pico A de CS 80%	67,000	57,500	53,000	42,600
	29,800	26,000	17,400	
Pico B de CS 80%	28,500	19,500	18,200	16,400
	14,200			

proteína en mayor proporción, misma que esta presente en alta concentración tanto en el antígeno total, como en CS y CS 80%, de igual manera se observa en las fracciones membranales amibianas (MI, MNV y MP).

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y 2-mercaptoetanol de las fracciones de CS (fig. 7, tabla IV) muestra 16 péptidos para el antígeno total, de los cuales 12 también se localizan en la fracción total de complejos solubles y 7 en el Pico A, donde los principales constituyentes son 2 péptidos de aproximadamente 67,000 y 53,000 daltones de peso molecular..

### 3. REACCIONES INMUNOLOGICAS.

La figura 8 muestra que todas las fracciones de complejos solubles son reconocidas, por doble inmunodifusión, tanto por suero de conejo anti-CS como por suero de paciente, con patrones similares; las fracciones antígeno total, CS, CS 100% y CS 80% presentan dos bandas de reconocimiento frente a ambos sueros (tabla V).

En la doble inmunodifusión de las fracciones celulares del trofozoíto se observa que todas reaccionan tanto con el suero de conejo anti-CS como con el suero de paciente, lo que sugiere la presencia de un antígeno común a todas las fracciones amibianas (fig. 9, tabla VI).

La presencia de albúmina sérica bovina del medio de cultivo como contaminante se verificó por doble inmunodifusión, enfrentando ASB (0.1 a 1.2 mg/ml) contra suero de conejo anti-CS, con resultados negativos.

En la figura 10 se compara el patrón inmunoelectroforético de las fracciones de CS frente al antisuero específico de conejo, observando un mayor número de bandas para CS 80% y únicamente cuatro para el Pico A.

Los datos de la tabla VII muestran los títulos de anticuerpos anti-amiba de los sueros de conejo y de paciente empleados. Para sensibilizar los eritrocitos tanizados se utilizó antígeno total de amiba a una concentración de 2 mg proteína/ml.

Tabla V. Doble inmunodifusión de las fracciones de CS.

Letra	Fraccion	bandas de precipitación	
		suero conejo	suero paciente
A	antígeno total	2	2
B	complejos solubles	2	2
C	CS 33%	1	1
D	CS 100%	2	2
E	CS 80%	2	2
F	Pico A de CS 80%	1	1



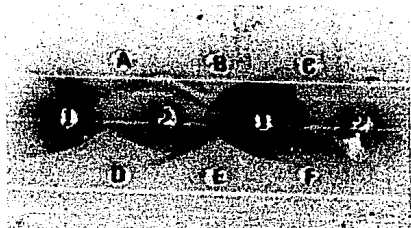


Figura 8. Doble Inmunodifusión de las fracciones de CS.

1 = suero de conejo anti-CS  
2 = suero de paciente

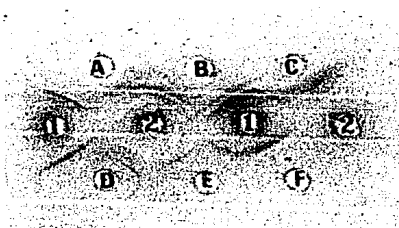


Figura 9. Doble Inmunodifusión de las fracciones ambianas.

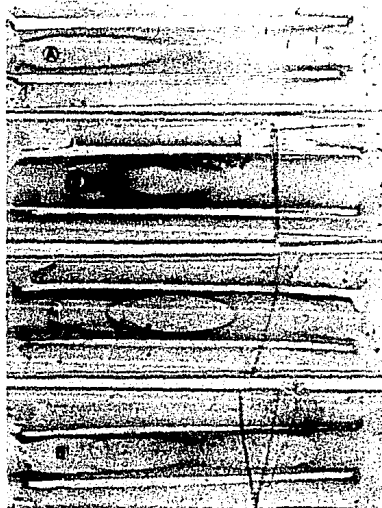


Figura 10. Inmunolectroforesis. Sistema: fracciones de Complejos Solubles-antisuero de conejo.  
A, complejos solubles 33% (3); B, complejos solubles 80% (6); C, complejos solubles 100% (5); D, pico A de CS 80% (4).  
entre paréntesis se indica en número de bandas de precipitación.

Tabla VI. Doble inmunodifusión de las fracciones amibianas.

Letra	Fracción	bandas de precipitación	
		suero conejo	suero paciente
A	antígeno total	2	2
B	complejos solubles	2	2
C	membranas internas	1	1
D	memb. no vesículas	1	2
E	memb. plasmáticas	1	1
F	pico A de CS 80%	1	1

Tabla VII. Título de anticuerpos anti-amiba por hemaglutinación pasiva con eritrocitos tanzados.

Suero	título
suero de paciente 124	1:10,240
suero de paciente 126	1:10,240
suero de conejo anti-CS	1: 2,560

## V. DISCUSION.

Previo al aislamiento de membranas los trofozoítos se lavaron exhaustivamente, para eliminar los componentes del medio de cultivo, y evitar así la presencia de albúmina sérica bovina como contaminante en las fracciones celulares, que conduciría a resultados erróneos al considerarla como una proteína amibiana, siendo realmente un constituyente del suero bovino del medio de cultivo (17). Por doble inmunodifusión se comprobó la inexistencia de esta proteína en la fracción de complejos solubles.

En el aislamiento de membranas plasmáticas, internas y no vesiculadas realizado según el método descrito por Aley y cols., más del 60% del peso seco y de la proteína de Entamoeba histolytica corresponde a la fracción denominada complejos solubles. El análisis electroforético en gel de poliacrilamida de los complejos solubles y de los tres tipos de membranas, no se manifiesta diferencias entre ellos, aunque también se observan varios componentes similares, sobre todo entre MNV y MP, se puede suponer que el método es de baja resolución, pero la extensa endocitosis que presenta el parásito podría ser también causa de estas semejanzas. Recientemente Aley y su grupo demostraron que la membrana plasmática de E. histolytica de la cepa patógena HM1:IMSS, se interioriza rápidamente en forma de vesículas internas, y que la mayoría de los péptidos que constituyen sus membranas son similares a los de superficie (2).

Los porcentajes de proteína obtenidos para las fracciones membranales (MI, MNV y MP) de E. histolytica (HM1:IMSS) son mayores a los reportados por Aley (3), aunque no hay que pasar por alto que Aley trabajó con la cepa HK9:NIH, de baja patogenicidad, lo cual puede ser la causa de las diferencias. La relación carbohidrato/proteína mayor en las fracciones membranales se debe a la naturaleza glicoproteica de ellas, no obstante, los CS también contienen algunos carbohidratos (0.06) en proporción comparable a la obtenida por Khan y Meerovitch (23) para el extracto acuoso dializado de E. histolytica cepa

DKB (0.059).

La solubilidad de los CS recién aislados es muy alta, a diferencia de la muestra liofilizada que es muy insoluble, probablemente este efecto se debe a los carbohidratos presentes, ya que como demostraron Lawson y cols., los carbohidratos unidos covalentemente a las protefmas incrementan o disminuyen la solubilidad de estas, dependiendo del estado de glicosilación, del tipo de protefna y de la temperatura de trabajo (28).

La porción soluble del extracto amibiano crudo contiene varios antígenos, por lo que para definir su especificidad es necesario purificarlos. Así, como primera instancia, se realizó el aislamiento de la fracción de CS de otros componentes celulares y se procedió a su purificación mediante filtración en gel, obteniendo un perfil de elución similar al reportado para el extracto soluble de la cepa DKB (23). Dada la considerable heterogeneidad de las protefmas amibianas no fue posible una separación completa. Con el propósito de lograr una mayor purificación se recurrió a la precipitación fraccionada con sulfato de amonio; la mayor proporción de protefna de CS precipitó al 80% de saturación. El perfil cromatográfico de este material en Sephadex G-100 muestra la presencia de un primer pico (Pico A) bien definido, similar al obtenido con el material liofilizado, que indica la presencia de una protefna de alto peso molecular, que sale con el volumen de exclusión.

La determinación del peso molecular de las fracciones no fue posible por carecer de los marcadores adecuados, pero si se considera que el límite de exclusión del Sephadex G-200 es 600,000 daltones, se puede inferir que el constituyente del Pico A posee un peso molecular superior a los 600,000 daltones. Estos resultados concuerdan con los de Sawney y cols., quienes al cromatografiar el extracto acuoso de la cepa NIH:200 obtuvieron una primer fracción con peso molecular de 650,000 daltones (47).

En 1985 C. Agundis y cols. (comunicación personal) al realizar marcaje radiactivo con  $I^{125}$  y filtración en gel de Sepha-

dex de las fracciones membranales (MI, MNV y MP) separadas por el método de Aley, obtuvieron para los tres tipos de membranas de E. histolytica (HM1:IMSS) un primer pico de peso molecular elevado, similar al Pico A de CS 80%, hecho que explica la reacción de identidad observada entre las fracciones MI, MNV, MP y CS frente al suero de conejo anti-CS, ya que si bien el suero es específico para complejos solubles también reconoce las fracciones membranales debido a que comparten cuando menos un componente, que suponemos equivale al Pico A de CS. Además, se observó que la proteína de este primer pico no se marca con  $I^{125}$  y posiblemente esta sea la causa de que no se haya dado mayor trascendencia a su estudio, puesto que tradicionalmente lo que se marca ha sido objeto de investigación preferencial, no así las fracciones no marcadas.

Los resultados de PAGE-convencional y SDS-PAGE revelan la presencia de contaminantes traza aún en el material recromatografiado del Pico A, pero se debe considerar la posibilidad de degradación de la muestra durante el análisis, debido a la gran actividad lítica presente en la amiba. Recientemente Avila y cols. (4) demostraron que el inhibidor de proteasas serinicas PMSF a una concentración 2 mM, inhibe la actividad proteolítica de la cepa HM1:IMSS únicamente en un 25% a pH 7.5, y son estas precisamente las condiciones empleadas en el presente trabajo; y considerando que los autores citados demostraron que la mayor parte de las proteasas presentes en E. histolytica son de tipo sulfhidrúlico recomendamos en lo sucesivo el empleo de inhibidores específicos para ellas, como sería acetato fenil mercúrico o cualquier otro mercurial soluble a pH ligeramente alcalino, que es el pH usual de trabajo.

Se ha reportado que el extracto soluble de E. histolytica (DKB) es una glicoproteína compuesta por una mezcla de diferentes especies moleculares tanto ácidas como debilmente básicas, cuyos pesos moleculares varían de 1,450 a 65,000 daltones (23). Estos resultados son parecidos a los que se obtienen para la fracción CS; si bien, se encuentran dos péptidos de apro

ximadamente 67,000 y 53,000 daltones de peso molecular, principales constituyentes del Pico A, y para cuya purificación proponemos la realización de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex.

El principal constituyente del Pico A esta presente en todas las fracciones celulares de la amiba y representa al menos el 12.7% de la protefna total, este dato resulta similar al reportado por Sawney y cols., quienes encontraron que el primer pico, de 650,000 daltones, constituye el 14% de la protefna amibiana (cepa NIH:200) y sugieren que solo esta fracción es serológicamente activa (47).

Los resultados de doble inmunodifusión muestran que el Pico A presenta una banda semejante a la mostrada por el antígeno total, lo que confirma la localización subcelular de los antígenos importantes para el sistema inmune del conejo. Esta banda es antigénicamente similar a la banda de precipitación de todas las fracciones de complejos solubles y de todas las fracciones celulares de E. histolytica. La inmunoelectroforesis reveló un mayor número de bandas para todas las fracciones de CS que la doble inmunodifusión, indicando por un lado su heterogeneidad antigénica y por el otro una mejor resolución del método. Las fracciones CS 33%, CS 80% y CS 100% comparten algunas bandas revelando que no hubo una buena separación de los componentes, aunque el Pico A muestra únicamente cuatro bandas y el antígeno dominante de esta fracción también esta presente en las fracciones CS 80% y CS 100%.

Los títulos de hemaglutinación pasiva demuestran que los componentes de complejos solubles son importantes para el sistema inmune del conejo, ya que resultaron ser inmunogénicos, pero hay mayor cantidad de anticuerpos anti-amiba en el suero de paciente.

Las pruebas inmunológicas ponen de manifiesto que existe un antígeno que es comun al Pico A y a todas las fracciones amibianas, por lo que todas las fracciones son reconocidas por el suero de conejo anti-CS, pero el hecho de mayor relevancia es

que son reconocidas por el suero de paciente con amibiasis, lo que indica que durante el proceso de la infección el sistema inmune humano produce anticuerpos específicos para el componente del Pico A, el cual es un antígeno tanto de citoplasma como de superficie, si bien es mucho más abundante en la fracción de complejos solubles.

Debido al rápido recambio entre la superficie y las membranas internas de E. histolytica, los determinantes antigénicos se localizan tanto en membranas citoplásmicas como en plasmáticas, esto explicaría la inmunogenicidad efectiva de las fracciones ribosomal y lisosomal y la localización de los componentes antigénicos en la superficie amibiana, ampliamente reportado (6, 21, 22, 23, 41). Es pues de particular importancia la purificación y caracterización de antígenos subcelulares, ya que su abundancia facilita su estudio y abre la posibilidad de investigar no solo sobre la inducción de inmunidad protectora en hamsters u otros animales de experimentación, sino además en la obtención de anticuerpos monoclonales altamente específicos y aún más en la posibilidad de desarrollar pruebas de diagnóstico mas sensibles que las actuales.

## VI. CONCLUSION.

Entamoeba histolytica (HM1:IMSS) presenta como principal componente una proteína de alto peso molecular, superior a los 600,000 daltones, con bajo contenido de carbohidratos. Dicha proteína constituye al menos el 12.7% de la proteína total y esta presente en todas las fracciones celulares del trofozoito, si bien se encuentra básicamente en la fracción denominada complejos solubles. Su patrón de precipitación es parecido al que muestra el antígeno total. Además, el componente del Pico A es reconocido por el suero de paciente con amibiasis y muestra reacción de identidad con las fracciones amibianas, lo que sugiere que es un antígeno importante para el sistema inmune humano y confirma que esta presente tanto en la superficie como en el interior de la célula.

Los resultados obtenidos son importantes si se considera que la identificación y purificación de los antígenos amibianos relevantes en términos de la respuesta inmune humoral, pueden conducir a su producción masiva a través de anticuerpos monoclonales y proveer las bases para la inducción de inmunidad protectora y el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico.



## VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Alam, M., and Ahmad, S., 1974. Immunogenicity of Entamoeba histolytica antigen fractions. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 68: 370-373.
2. Aley, S. B., Cohn, Z. A., and Scott, W. A., 1984. Endocytosis in Entamoeba histolytica. Evidence for a Unique Non-acidified Compartment. J. Exp. Med., 160: 724-737.
3. Aley, S. B., Scott, W. A., and Cohn, Z. A., 1980. Plasma Membrane of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med., 152: 391-404.
4. Avila, E. A., Sánchez-Garza, M., and Calderón, J., 1985. Entamoeba histolytica and E. invadens: Sulfhydryl-Dependent Proteolytic Activity. Protozool., 32 (1): 163-166.
5. Barnes, R. D., 1977. Zoología de los invertebrados. 3a. ed. Interamericana; pág. 33.
6. Boonpucknavig, S., Lynraven, G. S., Nairn, R. C., and Ward H. A., 1967. Subcellular localization of Entamoeba histolytica antigen. Nature, 216: 1232-1233.
7. Bos, H. J., 1973. The Problem of Pathogenicity in Parasitic Entamoeba. Acta Leidensia, 40: 1-112.
8. Calderón, J., and Tovar-Gallegos, R., 1980. Resistance to immune lysis induced by antibodies in Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Méd. (Méx.), 11 (Suppl. 1): 241-243.
9. Croos, G. A. M., 1975. Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei. Parasitol., 71: 393-417.
10. Diamond, L. S., 1968. Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 and E. histolytica-like amebae. J. Parasitol., 54: 1047-1056.
11. Diamond, L. S., 1980. Axenic cultivation of Entamoeba histolytica: progress and problems. Arch. Inv. Méd. (Méx.), 11 (Suppl. 1): 47-54.
12. Diamond, L. S., Harlow, D. R., and Cunnick, C. C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histo-

- lytica and other Entamoeba. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 72 (4): 431-432.
13. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, J., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350-356.
  14. Eaton, R. D. P., Meerovitch, E., and Costerton, J. W., 1970. The functional morphology of pathogenicity in Entamoeba histolytica. Ann. Trop. Med. Parasit., 64: 299-304.
  15. Fahey, J. L., and Terry, E. W., 1973. Ion exchange chromatography and gel filtration. In: Weir, D. M. (ed.). Handbook of Experimental Immunology. 2a. ed. Blackwell, Great Britain; págs. 7.1-7.15.
  16. Fehrstrom, H., Moberg, U., 1977. SDS and Conventional Polyacrylamide Gel Electrophoresis with LKB 2117 Multiphor. LKB, Sweden, application note 306: 1-15.
  17. García-Tamayo, F., Hascimoto-Yañez, R., y Kumate, J., 1980. Proteínas propias y del medio de cultivo en los trofozoitos de E. histolytica obtenidos axénicamente. Arch. Inv. Méd. (Méx.), 11 (Suppl. 1): 159-162.
  18. Garvey, J. S., Cremer, N. E., and Sussdorf, D. H., 1977. Methods in Immunology. A laboratory Text for Instruction and Research. 3a. ed. W. A. Benjamin, Inc., London; págs. 7-38, 183-185, 313-321, 328-335.
  19. Ghadirian, E., and Meerovitch, E., 1984. Lectin-induced agglutination of trophozoites of different species and strains of Entamoeba. Z Parasitenkd, 70: 147-152.
  20. Gitler, C., Calef, E., and Rosenberg, I., 1984. Cytopathogenicity of Entamoeba histolytica. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., B 307: 73-85.
  21. Kessel, J. F., Lewis, W. P., Pasquel, C. M., and Turner, J. A., 1965. Indirect hemagglutination and complement fixation tests in amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 14 (4): 540-550.
  22. Khan, Z. A., and Meerovitch, E., 1968. A comparative study of antigens of some of the "histolytica-type" strains of

- Entamoeba. A Qualitative and Quantitative Evaluation of Antigens by Indirect Hemagglutination, Gel-Precipitation, and Immunoelectrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 17 (4): 528-539.
23. Khan, Z. A., and Meerovitch, E., 1970. Studies on the purification of Entamoeba histolytica antigens by gel filtration. I. Some physicochemical properties of the isolated fractions. Can. J. Microbiol., 16: 485-492.
  24. Khan, Z. A., and Meerovitch, E., 1970. Studies on the purification of Entamoeba histolytica antigens by gel filtration. II. The antigenic properties of the isolated fractions. Can. J. Microbiol., 16: 493-498.
  25. Krupp, I. M., 1977. Definition of the antigenic pattern of Entamoeba histolytica, and immunoelectrophoretic analysis of the variations of patient response to amebic disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 26: 387-392.
  26. Kudo, R. R., 1976. Protozoología. 5a. ed. Continental, México; págs. 416-421.
  27. Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
  28. Lawson, E. Q., Hedlund, B. E., Ericson, M. E., Mood, D.A., Litman, G. W., and Middaugh, R., 1983. Effect of Carbohydrate on Protein Solubility. Arch. Biochem. Biophys., 220 (2): 572-575.
  29. Lehninger, A. L., 1981. Proteínas: purificación y caracterización. En: Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2a.ed. Omega, Barcelona; págs. 161-187.
  30. Lowe, C. Y., and Maeraith, B. C., 1970. Electron microscopy of axenic strain of Entamoeba histolytica. Ann. Trop. Med. Parasitol., 64: 293-298.
  31. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

32. Ludvík, J., and Shipstone, A. C., 1970. The Ultrastructure of Entamoeba histolytica. Bull. Org. Mond. Santé, 43: 301-308.
33. Lunde, M. N., and Diamond, L. S., 1969. Studies on antigens from axenically cultivated Entamoeba histolytica and Entamoeba histolytica-like amebae. Am. J. Trop. Med. Hyg., 18 (1): 1-6.
34. Martínez-Palomo, A., 1982. The Biology of Entamoeba histolytica. John Wiley & Sons, Ltd., Great Britain; 161 págs.
35. Martínez-Palomo, A., González-Robles, A., and de la Torre, M., 1973. Selective agglutination of pathogenic strains of Entamoeba histolytica induced by concanavalin A. Nature New Biol., 245: 186-187.
36. Mattern, C. F., Keister, D. B., and Natovitz, P. C., 1982. Virulence of Entamoeba histolytica upon continuous axenic cultivation. Arch. Inv. Méd. (Méx.), 13 (Suppl. 3): 185-190.
37. McLaughlin, J., and Meerovitch, E., 1975. The surface membrane and cytoplasmic membranes of Entamoeba invadens (Rothain 1934). I. Gross chemical and enzymatic properties. Comp. Biochem. Physiol., 52B: 477-486.
38. McLaughlin, J., and Meerovitch, E., 1975. The surface membrane and cytoplasmic membranes of Entamoeba invadens (Rothain 1934). II. Polypeptide and phospholipid composition. Comp. Biochem. Physiol., 52B: 487-497.
39. Miller, J. H., Swartzwelder, J. C., and Deas, J. E., 1961. An electron microscopic study of Entamoeba histolytica. J. Parasitol., 47: 577-587.
40. Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A., and Sánchez, T., 1983. Entamoeba histolytica Phagocytosis as a Virulence Factor. J. Exp. Med., 158: 1511-1521.
41. Parkhouse, M., Cid, M. A., y Calderon, J., 1978. Identificación de antígenos de membrana de Entamoeba histolytica con anticuerpos de pacientes de amibiiasis. Arch. Inv. Méd. (Méx.), 9 (Suppl. 1): 211-218.

42. Pharmacia Fine Chemicals, 1978. Gel filtration: theory and practice. Uppsala, Sweden; 64 págs.
43. Pinto da Silva, P., Martínez-Palomo, A., and González-Robles, A., 1975. Membrane structure and surface coat of Entamoeba histolytica. Topochemistry and dynamics of the cell surface: Cap formation and microexudate. J. Cell. Biol., 64: 538-550.
44. Robinson, G. L., 1968. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 62 (2): 285-294.
45. Sargeant, P. G., Williams, J. E., Bhojnani, R., Campos, J. E., and Gómez, A., 1982. The epidemiology of Entamoeba histolytica in a rural and urban area of Mexico, A pilot survey II. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 76: 208-210.
46. Sargeant, P. G., Williams, J. E., Kumate, J., and Jiménez, E., 1980. The epidemiology of Entamoeba histolytica in Mexico city. A pilot survey I. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 74: 653-656.
47. Sawney, S., Chakravarti, R. N., Jain, P., and Vinayak, V. K., 1980. Immunogenicity of axenic Entamoeba histolytica antigen and its fractions. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 74 (1): 26-29.
48. Weber, K., and Osborn, M., 1969. The Reliability of Molecule Weight Determinations by Dodecil Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem., 244: 4406-4412.
49. Wittner, M., And Rosenbaum, R. M., 1970. Role of bacteria in modifying virulence of Entamoeba histolytica. Studies of amebae from axenic cultures. Am. J. Trop. Med. Hyg., 19: 755-761.
50. World Health Organization, 1969. Amoebiasis. World Health Org. Tech. Report Series, No. 421.