

03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS



**“IDENTIFICACION DE PROTEINAS DE Entamoeba histolytica
CAPACES DE INDUCIR PROTECCION EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE AMIBIASIS”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMÉDICA

B A S I C A

P R E S E N T A:

Q.F.B. ELIZABETH ADRIANA BRITO MARTINEZ

MEXICO

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL LABORATORIO DEL DR. LIBRADO ORTIZ ORTIZ, PERTENECIENTE AL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, BAJO LA ASESORIA DE LA DRA. BLANCA HAYDE RUIZ ORDAZ DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR PERTENECIENTE AL MISMO INSTITUTO. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

Agradecimientos:

A mis padres : **Amado** y **María Elena**
por su apoyo y ejemplo, el cual ha
sido el motivo que me impulsa a
seguir adelante

A mis tíos: **Angel, Ilde** y **Domingo**,
Que siempre me apoyaron bajo
cualquier circunstancia.

A **Angel Oliva** y **Antonio Ramírez**
por el apoyo técnico que me dieron
durante la realización de este
trabajo.
Así mismo a **Don Carmelo, Charly** y
el **Sr. José**, por quienes en gran
manera fue posible realizar este
trabajo.

A mis hermanos: **Luis Amado**,
Beatriz y **Patricia** con los que he
compartido todos los momentos de
mi vida.

A mi **Fer**: por su amor, apoyo y
comprensión.

A mis amigos y compañeros de
laboratorio: **Martha, Reyna, Ana**,
Cuahutémoc, Carlos, César,
Mónica, Nancy, Arturo, Claudia,
Alejandro, Ignacio, Patricia, Irma,
Luis y **Gustavo**, con quienes he
compartido buenos y malos
momentos durante la realización de
este trabajo, y de los que siempre
recibí su apoyo en todo momento

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y METODOS	16
RESULTADOS	22
DISCUSION	39
BIBLIOGRAFIA	44

RESUMEN

En México, la amibiasis se considera como uno de los principales problemas de salud pública, de ahí, la imperante necesidad de contar tanto con métodos de diagnósticos específicos así como con vacunas eficaces que permitan erradicar su endemidad en la población.

En base a lo anterior, se planteó como objetivo principal de este proyecto, llevar a cabo la identificación de proteínas de *E. histolytica* capaces de inducir protección en un modelo de absceso hepático amibiano (AHA) en hámster. Inicialmente se evaluó el grado de protección conferido por diferentes fracciones de la amiba (antígeno total, fracción membranal y fracción soluble) en dicho modelo. A partir de estos experimentos, se pudo observar que la protección conferida por la fracción membranal fue >95%. La diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a la protección conferida por el antígeno total (93%), pero sí ligeramente con respecto a aquella conferida por la fracción soluble (80%).

Posteriormente se llevó a cabo la identificación de antígenos de *E. histolytica* involucrados en protección, a partir de los sueros de los animales que mostraron remisión parcial y total del absceso en el modelo de AHA, lográndose identificar tres proteínas de membrana altamente antigénicas con pesos moleculares de 125, 65 y 45 kDa, las cuales posteriormente fueron purificadas mediante electroelución a partir de geles de poliacrilamida-SDS en condiciones no reductoras. Así mismo, se evaluó la capacidad protectora de los mismos tanto de manera individual como en forma conjunta, obteniendo más de un 90 % de protección en el modelo de AHA en hámster.

Los resultados mostrados en el presente trabajo permiten proponer a estos antígenos membranales como candidatos potenciales en la profilaxis de la amibiasis.

INTRODUCCION

AMIBIASIS

DEFINICION

La amibiasis ha sido definida como la condición en la cual el individuo es portador de *Entamoeba histolytica* con o sin manifestaciones clínicas ⁽¹⁾

ESTADIOS DE LA *Entamoeba histolytica*

Las formas "típicas" de *E. histolytica* incluyen tanto la fase "minuta" o formadora de quistes, como las amibas grandes, eritrofagocíticas que se encuentran en la amibiasis invasora.

CICLO DE VIDA DE LA *E. histolytica*

El ciclo vital completo de la *E. histolytica* consta de cuatro fases consecutivas, que son: el trofozoito, el prequiste, el quiste y el metaquiste.

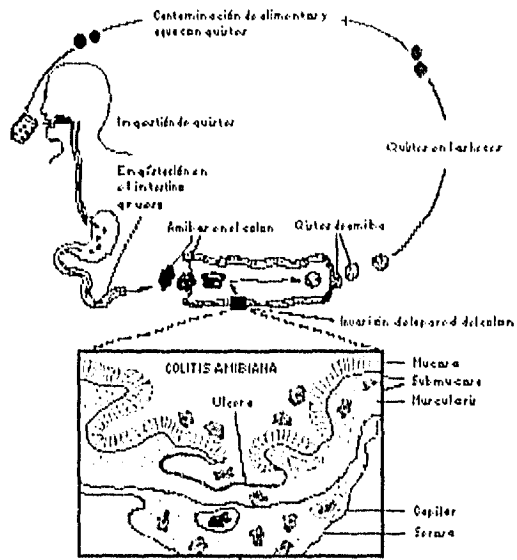
TROFOZOITO: (la forma ameboide) este mide de 15 a 20 μm , y se encuentra en las heces de los pacientes con sintomatología aguda. Los trofozoitos pueden ser esféricos u ovalados, cuentan con una membrana celular delgada, un solo núcleo, presentando una cromatina condensada en el interior de la membrana nuclear y un núcleo central ⁽²⁾

QUISTE: (forma infectiva) Esta forma se encuentra sólo en las heces, sin embargo, los quistes no invaden al tejido. Son esféricos y tienen una pared delgada, miden de 5 a 25 μm y usualmente tienen cuatro núcleos. Estos pueden ser adquiridos tanto por ingestión de agua o alimentos contaminados, como por manos sucias (fecalismo). Una vez ingerido el quiste pasa a través del estómago y se desenquista en la parte inferior del íleon. Una amiba metaquistica contiene cuatro núcleos, los cuales se dividen dando lugar a cuatro trofozoitos metaquisticos, que a su vez crecen hasta alcanzar su tamaño adulto. Los trofozoitos pueden colonizar alguna porción del intestino delgado, pero el área de máxima infección es el ciego ⁽²⁾

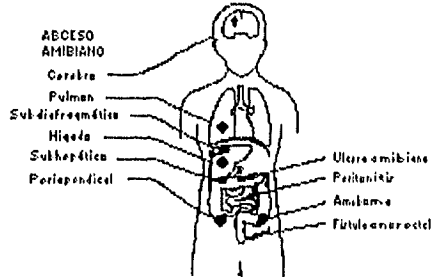
PREQUISTE: El prequiste forma una pared quística para desarrollar así un quiste cuadrinucleado maduro en el proceso de transmisión al próximo huésped. El paso de las formas quística y prequística a través del intestino es muy lenta.

Los pacientes con sintomatología de colitis amibiana usualmente presentan ambas formas (quistes y trofozoitos), sin embargo, los trofozoitos solo sobreviven brevemente fuera del cuerpo y son destruidos por las secreciones gástricas ⁽²⁾

CICLO DE VIDA DE LA *Entamoeba histolytica*



COMPLICACIONES DE LA AMIBIASIS



CARACTERISTICAS GENERALES DE LA AMIBIASIS

La *E. histolytica* debe su nombre a su actividad lítica sobre los tejidos. Las manifestaciones clínicas son variadas dependiendo de la patogenicidad de la cepa, la intensidad de la infección, la flora bacteriana, el sitio y extensión del tejido dañado ya que el trofozoito invade y ulcera la mucosa colónica, causa diarrea, constipación intermitente, distensión abdominal y flatulencia de mal olor. Las complicaciones incluyen ameboma severo del colon, absceso hepático, absceso pulmonar y amibiasis cutánea⁽²⁾

Los síntomas de la disentería amibiana pueden aparecer una semana o dos después de la infección. La gravedad y la manera como se presentan las manifestaciones clínicas son variadas. Con frecuencia la diarrea no es intensa y los síntomas generales son relativamente leves. El comienzo es generalmente gradual, con dolor abdominal de tipo cólico y fiebre. Las evacuaciones son líquidas, con sangre y con moco, y frecuentemente se acompaña con tenesmo. Los ataques agudos pueden remitir espontáneamente. Un tratamiento adecuado usualmente es seguido por el alivio completo de los signos y de los síntomas intestinales. Como complicaciones no frecuentes de la amibiasis intestinal pueden ocurrir el ameboma, la perforación o una hemorragia⁽⁵⁾.

Algunas veces la amibiasis intestinal se presenta como infección fulminante con diarrea sangrienta profusa acompañada con fiebre alta, náusea, vómito y anorexia. El pronóstico es frecuentemente mortal en tales casos y la muerte del paciente puede sobrevenir a consecuencia de hemorragia o perforación intestinales⁽⁵⁾

La amibiasis intestinal, patente o no manifiesta, puede ser seguida por amibiasis hepática debida a la extensión de la infección al hígado a través de la vena porta, sin embargo, la mayor parte de las veces no existen datos previos de sintomatología intestinal. Los "abscesos" hepáticos amibianos, que en realidad representan un foco de necrosis en el hígado, son más frecuentes en los adultos. En un principio hay molestias en la región hepática, seguida por fiebre, anorexia, sudoración, postración y dolor en aumento en el cuadrante superior derecho del abdomen, en ocasiones puede haber hipo debido a irritación del nervio frénico. El hígado está aumentado de volumen y es sensible. A menos de que se administre el tratamiento adecuado generalmente los abscesos aumentan de volumen e invaden las estructuras adyacentes ocasionando lesiones pulmonares, pericárdicas, peritoneales o cutáneas. También se pueden presentar lesiones primarias en los pulmones y en el cerebro. Como resultado de una quimioterapia adecuada casi todas las lesiones invasoras curan sin formaciones cicatriciales⁽⁶⁾.

La experiencia clínica ha señalado que la amibiasis invasora es más frecuentemente en zonas geográficas donde prevalecen algunas cepas virulentas de

E. histolytica. En dichas áreas las infecciones repetidas son frecuentemente debido básicamente a la transmisión fecal, por deficiencia en la eliminación de los excrementos humanos y al manejo inadecuado de los alimentos⁽⁵⁾.

Entre los factores de riesgo para la infección por *E. histolytica* se han considerado, la situación geográfica, el clima, la raza, el sexo, la edad, las condiciones nutricionales y las inmunológicas, la dieta y los hábitos sexuales del huésped⁽⁶⁾.

ANTECEDENTES

EPIDEMIOLOGIA

La amibiasis es un problema de carácter cosmopolita. Los datos epidemiológicos a nivel mundial sugieren una prevalencia de alrededor de 500 millones de personas infectadas anualmente, con índices de morbilidad de 10% y de mortalidad de 0.1% (3).

Aunque la amibiasis también se presenta en países altamente desarrollados, ésta se observa con mayor frecuencia en países que aún no han alcanzado un adecuado desarrollo económico. De ahí que este padecimiento sea considerado como un ejemplo claro de "patología de la pobreza", concepto que abarca: desnutrición, hábitos higiénicos deficientes y uso inapropiado de aguas residuales para la agricultura (4,5).

Dentro de los países que por su alta prevalencia de amibiasis son considerados como endémicos se encuentran: India, Egipto, Turquía y México (6)

En México, aproximadamente 75% de la población se encuentra infectada con *E. histolytica*, y aunque la mayoría son portadores asintomáticos, la amibiasis invasiva sigue conservando un carácter endémico dentro de la población en

general⁽⁶⁾. En 1993, el número de casos de amibiasis hepática registrados fue de 5 000 personas afectadas, con un promedio mensual de alrededor de 500 casos repartidos en toda la República⁽⁷⁾, siendo esta forma clínica 10 a 30 veces más frecuente en los adultos que en los niños⁽⁸⁾. En los últimos años se ha observado una reducción considerable en la tasa de mortalidad por esta causa (12.8% en 1970 y 3.8% en 1990)⁽⁹⁾. La frecuencia de amibiasis intestinal es mayor en la población infantil (1 a 5 años de edad) que en los adultos^(4,10,11), de ahí que ésta se encuentre clasificada dentro de las principales infecciones intestinales las cuales representan la segunda causa de muerte en niños⁽⁷⁾.

Con el objeto de reducir la endemidad de la amibiasis no sólo en México sino en el mundo, diversos grupos de investigación han sumado sus esfuerzos en el estudio de este parásito. Esto ha permitido tener un mayor conocimiento tanto de la naturaleza y especificidad antigénica de la superficie de la amiba, como de aquellos factores que se ven involucrados directa o indirectamente en la patogenicidad del parásito, lo cual permite entender más claramente los mecanismos y factores que están involucrados en la interacción huésped-parásito^(12,13,14)

De la misma manera, otros grupos interesados en esta problemática han venido realizando diversos esfuerzos que han permitido contar, tanto con un modelo experimental de amibiasis hepática ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ como con diferentes métodos que permiten evaluar el grado de virulencia de la amiba en esta condición⁽¹⁹⁻²²⁾.

DIAGNOSTICO

La serología representa un proceso cada vez más importante en el diagnóstico debido a que el examen microscópico es difícil, requiere personal altamente capacitado además de que no existen diferencias morfológicas entre amibas patógenas y no patógenas⁽⁵⁾. De ahí, la necesidad de contar con métodos prácticos y específicos para la detección de antígenos en las heces y en el suero.

En base a estos antecedentes, se han desarrollado diversas metodologías que permiten resaltar la función de los anticuerpos como herramienta en el diagnóstico clínico y epidemiológico⁽²³⁾. Los anticuerpos que se producen en una infección amibiana pueden ser encontrados en la circulación 7 días después de haberse manifestado los primeros síntomas y el título de éstos, en muchos casos no correlaciona con la severidad de la infección.

Dentro de las principales técnicas que emplean antígeno de *E. histolytica* para la detección de anticuerpos circulantes, se encuentran la contraelectroforesis (CIE) y la hemaglutinación indirecta (HAI), ambos métodos tienen un alto grado de sensibilidad y especificidad, ya que coinciden hasta en un 90% de los casos en lo que respecta a resultados positivos y negativos. La HAI identifica bajos niveles de anticuerpos, por el contrario la CIE es un método más rápido y sensible⁽²⁴⁾. El ensayo inmunoenzimático (ELISA) se ha empleado tanto en el diagnóstico de

amibiasis humana como en el de amibiasis experimental, observándose en ambos casos resultados comparables con la HAI y la CIE^(25,26).

La identificación de anticuerpos IgG anti-amiba puede realizarse mediante el empleo de proteína A de *Staphylococcus aureus*⁽²⁷⁾. Asimismo cabe mencionar que el empleo tanto de anticuerpos monoclonales como de sueros hiperinmunes por el método de ELISA permiten la detección de trofozoitos en las heces, lo cual constituye un avance potencial en el diagnóstico de esta enfermedad^(28,29).

A pesar de todos los avances logrados en este sentido, aún se siguen realizando diversas investigaciones con el objeto de identificar y caracterizar aquellas proteínas altamente reactivas y específicas de la amiba en los diferentes estadios de la enfermedad que permitan hacer un diagnóstico adecuado, lo cual se ha hecho factible gracias tanto al desarrollo del cultivo axénico⁽³⁰⁾ como a la descripción, evaluación y estandarización de preparaciones celulares de la amiba⁽³¹⁾.

En este sentido, se han reportado algunas proteínas serológicamente reactivas empleadas en el diagnóstico de la amibiasis intestinal mediante inmunoelectrotransferencia, en la cual se observa una reactividad de 65% para las proteínas de 23, 24, 26 y 51 kDa y de 56% para la de 62 kDa; esta reactividad se ve incrementada hasta un 91.2% cuando se combinan las bandas comprendidas entre 62, 51 y 24 kDa⁽³²⁾.

De igual manera, existen reportes de una proteína recombinante rica en serina de aproximadamente 25 kDa, la cual se ha utilizado para el serodiagnóstico de la amibiasis invasiva aguda por ELISA; esta prueba muestra una sensibilidad de 79% y una especificidad de 87% tanto en sueros de pacientes con absceso hepático amibiano como en aquellos que presentan amibiasis intestinal invasiva⁽³³⁾.

Sin embargo, estos son sólo algunos hallazgos que sientan las bases en el esfuerzo de obtener resultados más confiables que permitan ofrecer un diagnóstico temprano y un tratamiento oportuno.

PROFILAXIS

La rareza de la recurrencia de la amibiasis invasora en los seres humanos ha estimulado los estudios relacionados con la amibiasis extraintestinal (absceso hepático amibiano) y el uso de los antígenos “específicos” de *E. histolytica* en el hombre y de su eficacia para generar una respuesta inmune protectora en voluntarios humanos⁽²⁴⁾.

No obstante los numerosos avances sobre el entendimiento de las interacciones amiba-huésped, el conocimiento que se tiene en relación a la especificidad y la naturaleza antigénica de la superficie del parásito es limitada⁽¹²⁾. No ha sido sino hasta 1978 que con el desarrollo del cultivo axénico⁽³⁰⁾ se han

facilitado los estudios que nos permiten en la actualidad, tener un conocimiento más detallado tanto de estos aspectos, como de aquellos factores que influyen directa o indirectamente en la patogenicidad del microorganismo; además de contar con un modelo experimental de amibiasis hepática (15-18) y con métodos que permiten evaluar el grado de virulencia de la amiba en el mismo (19-22).

En la actualidad se ha logrado proteger a roedores contra el AHA, con antígenos crudos o purificados de *E. histolytica*⁽³⁶⁻⁴³⁾. Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos realizados en la inducción de inmunidad protectora contra la amibiasis, ésta todavía se encuentra en fase experimental⁽³⁴⁾. De ahí el interés de diversos grupos por aislar y caracterizar mediante diferentes metodologías, antígenos de diferentes fracciones de la amiba que por su participación directa en la infección pudiesen ser empleados en el desarrollo de vacunas eficaces^(13,35).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La amibiasis en México sigue considerándose dentro de los principales problemas de salud pública⁽⁵⁾. De ahí, surge la imperante necesidad de aumentar los esfuerzos tanto en el diseño de métodos de diagnóstico más específicos como en el desarrollo de vacunas eficaces, las cuales representarían un avance tecnológico esencial en el control de la endemidad del parásito.

Tomando en cuenta diversos estudios⁽³⁵⁻⁴²⁾, en los que se reporta la inducción de inmunidad activa en hámsters con antígenos amibianos crudos y purificados, así como los antecedentes de que algunos de los componentes de la superficie membranal del parásito, posiblemente confieren protección al huésped después de infecciones recurrentes invasivas^(13,14,35), nos propusimos en este trabajo llevar a cabo la identificación y purificación de aquellos antígenos de *E. histolytica* que, además de ser altamente reactivos para los sueros de animales previamente inmunizados con diferentes fracciones del parásito, fuesen también capaces de conferir protección, en un modelo experimental de amibiasis hepática.

OBJETIVOS

GENERAL

Identificación de proteínas de *Entamoeba histolytica* capaces de inducir protección en un modelo experimental de amibiasis hepática.

PARTICULARES

- 1.- Obtención de diferentes fracciones de *E. histolytica* (total, membranal y soluble) mediante diferentes métodos.
- 2.- Evaluación del grado de protección conferido por las diferentes fracciones de *E. histolytica* (total, membranal y soluble) en un modelo de Absceso Hepático Amibiano (AHA) en hámster.
- 3.- Identificación de las proteínas inmunorreactivas de *E. histolytica* con los sueros de los animales que mostraron protección.
- 4.- Purificación de las proteínas inmunorreactivas de las diferentes fracciones de *E. histolytica* por electroelución a partir de geles de poliacrilamida.
- 5.- Evaluación del grado de protección conferido por las proteínas electroeluidas en el modelo de AHA en hámster.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES. Se emplearon hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*) hembras, de 4 semanas, tanto para los ensayos de protección como para el mantenimiento de los trofozoitos (cepa HM1-IMSS).

CULTIVOS DE AMIBA. Tanto para la obtención de antígeno como para los ensayos de desafío y protección, se utilizaron trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS recién inoculados en hígado de hámster los cuales se cultivaron en condiciones axénicas en medio TYI-S-33⁽³⁰⁾. Los trofozoitos se cosecharon en la fase de crecimiento logarítmico (48-72 hr de cultivo).

DETERMINACION DE PROTEINAS. La determinación de proteínas tanto para el antígeno total como para las membranas totales, se realizó de acuerdo al método de Lowry⁽⁴⁶⁾ empleando Albúmina Sérica Bovina (BSA, Sigma) como proteína de referencia.

PREPARACION DE ANTIGENO TOTAL. Los trofozoitos cosechados en la fase logarítmica se lavaron tres veces en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.5 por centrifugación sucesiva a 150 X g durante 5 minutos. El paquete celular de la última lavada se resuspendió en PBS que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2mM, NÓ-p-tosyl-L-Lisina o clorometil cetona (TLCK) 2 mM

y N-tosyl-L-fenilalanina clorometil (TPCK) 2 mM como inhibidores de proteasas⁽⁴⁴⁾. Posteriormente los trofozoitos se homogenizaron con 200 golpes en un homogenizador de vidrio. Finalmente, al homogenizado se le determinó la concentración de proteína de acuerdo al método de Lowry⁽⁴⁶⁾ y se guardó en alícuotas a -70°C hasta su uso.

PREPARACION DE MEMBRANAS TOTALES. Los trofozoitos se lavaron de la misma manera que para la obtención de antígeno total. El paquete celular de la última lavada se homogenizó con 200 golpes en 10 volúmenes de amortiguador que contenía Sacarosa 0.25 M, (3-(3-Cholamido-propyl)-dimetilamonio)-1-propano sulfonato (CHAPS) 0.1%, Acido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y Etilen Glicol-bis (β -aminoetil eter) N,N,N',-Tetraacético (EGTA) 5 mM a 4°C. Este homogenado se centrifugó a 1000 X g durante 10 minutos y el sobrenadante se centrifugó a 105.000 X g durante 1 hr a 4°C⁽⁴⁸⁾. Posteriormente el botón fue resuspendido en PBS pH 7.5, determinándose la cantidad de proteína de la misma manera que para el antígeno total⁽⁴⁶⁾. Finalmente esta muestra se guardó en alícuotas a -70°C hasta su uso.

INMUNIZACION DE RATONES BALB/c con BSA Y SB. Se inocularon tres grupos de ratones BALB/c de 18 - 20 g de peso con 0.5 ml de suero bovino (SB), 100 μ g de albúmina sérica bovina (BSA) y 0.5 ml de medio de cultivo TYI-S-33 respectivamente, mediante 3 inyecciones con intervalo de una semana entre cada

inoculación . Los animales fueron sangrados por punción cardíaca una semana después de la última inoculación.

DOBLE INMUNODIFUSION (DID). Esta prueba se llevó a cabo de acuerdo al método de Ouchterlony⁽⁴⁶⁾. Se hicieron diluciones desde 1:2 hasta 1:36 con los sueros obtenidos de los ratones, éstos se pusieron a reaccionar en placas de inmunodifusión radial de agarosa al 1% en PBS con antígeno total. Las placas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

Para la tinción de las bandas de precipitación se utilizó una solución de anido black al 0.1% y se aclaró con ácido acético al 2% en alcohol metílico.

ELECTROFORESIS Y ELECTROTRANSFERENCIA. El patrón electroforético del antígeno total y de las diferentes fracciones de la *E.histolytica* se analizó en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones no reductoras⁽⁴⁷⁾ . Las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a papel de nitrocelulosa de acuerdo al método descrito por Towbin ⁽⁴⁸⁾. La nitrocelulosa se cortó en tiras de 4 mm que se incubaron con los sueros de los hámsters. La reacción antígeno-anticuerpo fué detectada mediante un conjugado anti-IgG de hámster peroxidado (Accurate No.Cat. JGY-035003) utilizando 1-4 cloronaftol (Sigma Chemical No.C-8890) como indicador de la reacción.

ELECTROELUCION DE LA MUESTRA. La electroelución de las proteínas a partir de los geles de poliacrilamida-SDS al 10% se llevó a cabo en una cámara de electroelución y concentración ISCO (ISCO No.Cat 68-1750-100), de acuerdo con las especificaciones establecidas por el fabricante, utilizando una solución amortiguadora de Tris 0.025M, glicina 0.192M y SDS 0.1% a una dilución 1:10. La electroelución de la muestras se llevó a cabo a 4°C durante 2 hrs a 3 watts.

ESQUEMA DE INMUNIZACION. Las pruebas de protección se llevaron a cabo siguiendo un esquema de 3 inmunizaciones con 100 µg de proteína total de cada una de las fracciones antigénicas estudiadas (AgT, AgM, Fel y Fell), en 200 µl de solución salina al 0.85% por vía intramuscular, administrándose con intervalos de una semana entre ellas. A los animales controles solo se les administró solución salina fisiológica.

Todos los animales fueron sangrados por punción cardíaca después de la segunda y tercera inmunización.

Nota: Las fracciones Fel y Fell, fueron dialisadas contra PBS 1X a 4°C durante 24 hrs previo a su uso.

DESAFIO. Previo al desafío, los hámsters fueron anestesiados con 0.025 ml de Pentobarbital sódico (0.063 g/ml Smith Kline, calculando la dosis en base a 1 ml por cada 2 ½ kg de peso) y entonces se les inocularon 1.5×10^5 trofozoitos por vía hepática mediante laparatomía. La herida practicada fué cerrada con grapas

quirúrgicas de 9 mm Clay Adams, (Clay Adams NO.7631, Division of Becton Dickinson and Company Parsippany, N. J. 07064) (50).

DETERMINACION DEL GRADO DE PROTECCION. La determinación del grado de protección se estimó en base al porcentaje de tejido sano (%TS), el cual está dado por la diferencia del peso entre el hígado total y la porción necrosada del mismo en porcentaje, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Protección} = \% \text{ TS} = (\text{PHN} \times 100) / \text{PHT}$$

TS= Tejido sano

PHN= Peso Hígado Necrosado

PHT= Peso Hígado Total

ANALISIS ESTADISTICO: La comparación de eficacia entre los diferentes antígenos (total, membranal, Fel y Fell) y los grupos control, se realizó mediante un análisis de varianzas empleando la prueba de Fisher's y la prueba t de Student para apreciar el significado de las diferencias entre las medias de las medidas de los tamaños de los AHA.

ENSAYO INMUNOENZIMATICO "ELISA". La determinación de los niveles de anticuerpos anti-*E.histolytica* en los animales inmunizados con los diferentes antígenos, se llevó a cabo en pozos para análisis inmunoenzimático (Immulon 2 Removawell, strips No.Cat. 011-010-6302. Dynatech, Laboratories, Inc), los cuales se sensibilizaron colocando 5 µg/pozo de antígeno total diluido en solución de

carbonatos (carbonato de sodio anhidro 0.03M y bicarbonato de sodio 0.002M) pH 9.5, toda la noche a 4°C. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces durante 5 minutos para eliminar el exceso de antígeno y se bloquearon con Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 1% en PBS 1X pH 7.2, durante 1 hr a 37°C. Transcurrido este tiempo se colocaron los sueros diluidos en PBS 1X pH 7.2, Tween 20 (0.03%), BSA (0.5%), y se volvió a incubar durante 1 hr a 37°C. A continuación la placa se incubó con el suero anti-hámster peroxidado (Accurate No.Cat. JGY-035003) durante 1 hr a 37°C. Como solución reveladora se utilizó orto-fenilenediamina y se detuvo la reacción con H₂SO₄. Las placas se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA Dynatech MR 650 (Dynatech, Laboratories, Inc).

RESULTADOS

DETERMINACION DE LA PUREZA DEL ANTIGENO AMIBIANO

En investigaciones anteriores con *E.histolytica* se demostró que las proteínas de membrana pueden inducir anticuerpos, ya sea en animales experimentales o en pacientes con amibiasis invasora. Sin embargo, se ha reportado la presencia de contaminantes del medio de cultivo, principalmente antígenos del suero bovino (44,51,52).

Se incluyó el siguiente procedimiento para garantizar los resultados de éste estudio, en el cual se inocularon 3 grupos de ratones BALB/c con pesos de 18 a 20 g, con albúmina sérica bovina BSA (Sigma) (Grupo I), medio TYI-S-33 (30) (Grupo II) y suero bovino (Biofluids, Rockville, MD (301) 424-4140) (Grupo III) respectivamente(53). Una semana después de la última inmunización, se sangraron los animales por el plexo retroorbital mezclando los sueros de cada grupo.

Las diluciones de los sueros de cada grupo se pusieron a reaccionar en placas de doble inmunodifusión (DID) frente a BSA, SB y medio TYI- S-33, según el caso, con el objeto de detectar la presencia de anticuerpos contra cada uno de ellos.

En las placas de DID se observó la presencia de anticuerpos dirigidos contra BSA y SB, pero no hacia los componentes del medio de cultivo TYI-S-33 (Fig 1).

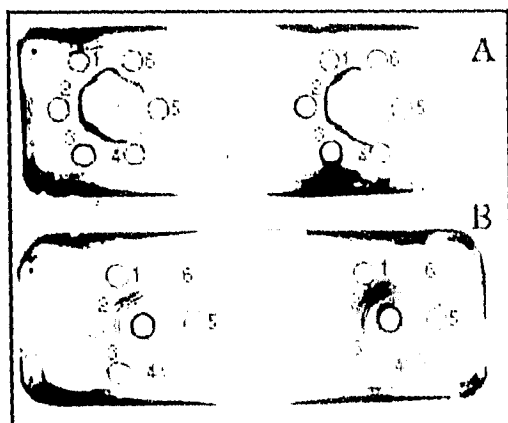


Fig 1. Determinación de anticuerpos contra suero bovino y BSA en los sueros hiperinmunes mediante doble inmuno difusión (DID) por duplicado. A) BSA (pozos centrales), B) suero bovino (pozos centrales), 1. suero de animales hiperinmunes sin diluir, 2. dilución 1:2, 3. dilución 1:4, 4. dilución 1:8, 5. dilución 1:16 y 6. dilución 1:32

Una vez confirmada la presencia de anticuerpos en los sueros de los ratones, éstos se pusieron a reaccionar con el antígeno total de *E. histolytica* separado por electroforesis y transferido a papel de nitrocelulosa⁽⁵⁰⁾, esto con el objeto de verificar la pureza del antígeno purificado por el método previamente descrito.

En la Fig 2, se muestran los resultados obtenidos con los sueros hiperinmunes de los ratones hacia el antígeno total. Se puede observar que ninguno de estos sueros muestra reactividad hacia el antígeno total de *E. histolytica* transferido.

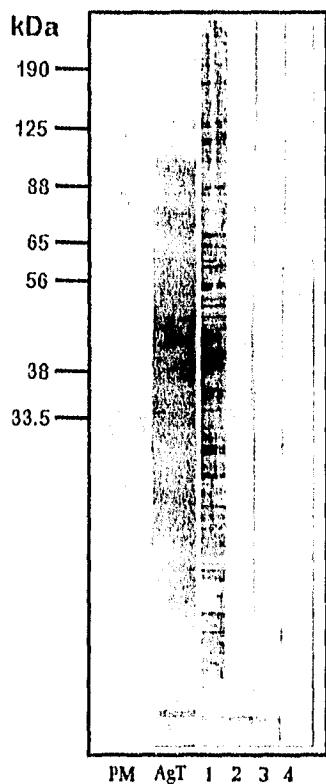


Fig 2. Determinación de la pureza del antígeno total de *E. histolytica*, por Inmunotransferencia. Carriles PM (pesos moleculares) y AgT teñidos con amido black. Carriles 1. Suero de ratones inmunizados con AgT (control), 2. Sueros de animales inmunizados con BSA, 3. Sueros de animales inmunizados con suero bovino y 4. Suero de animales inmunizados con médío TYI-S-33, revelados con 1-4 cloronaftol.

DEFINICION DEL PATRON ELECTROFORETICO DE LOS ANTIGENOS TOTAL Y MEMBRANAL

Una vez determinada la pureza del antígeno amibiano, se llevó a cabo la separación electroforética de los antígenos total y membranal en geles de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones no reductoras. El patrón mostrado fue de alrededor de 28 bandas para el antígeno total y de alrededor de 20 bandas para el antígeno membranal con un peso molecular de 12 a 200 kDa (Fig.3).

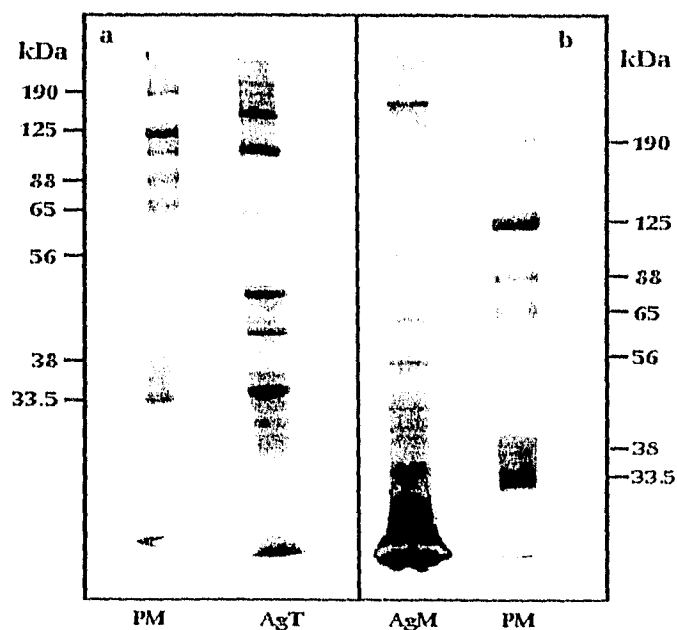


Fig 3. Determinación del patrón electroforético de los antígenos total y membranal de *E. histolytica* en geles de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones no reductoras mediante tinción con azul de Coomassie. a) antígeno total (AgT) y b) antígeno membranal (AgM).

INMUNIZACION Y DESAFIO DE ANIMALES EXPERIMENTALES

Con el objeto de determinar el grado de protección conferido por las diferentes fracciones de *E. histolytica* en nuestras condiciones, se propuso un esquema de inmunización de dos grupos de hámsters con dos diferentes antígenos de ameba, antígeno total (Grupo Ia), antígeno membranal (Grupo Ib) y un tercer grupo definido como control (Grupo IIIa), al cual solo se le administró solución salina, (ver esquema de inmunización en materiales y métodos).

Los resultados obtenidos de la inmunización de los animales de los Grupos I y II, antígenos total y membranal respectivamente, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el grado de protección conferido, ya que éste fue mayor de 90% para ambos casos, pero sí se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre los resultados obtenidos en estos dos grupos y el grupo control (Grupo III), al cual solo se le administró solución salina (Tabla 1 y Fig 4).

Tabla 1. Determinación del grado de protección conferido por los diferentes antígenos de *E. histolytica*

GRUPO*	MATERIAL DE INMUNIZACION	%DE PROTECCION
Ia	AgT	95 ±5
IIa	AgM	98 ±3
IIIa	CONTROL	33 ±3

* Todos los grupos estan conformados por 10 hámsters hembras de 4 semanas.

Grupo Ia vs Grupo IIIa p< .001

Grupo IIa vs Grupo IIIa p< .001

Grupo Ia vs Grupo IIa p NS

Así mismo, se pudo observar por inmunotransferencia que la reactividad de los sueros de los animales que lograron ser protegidos con los antígeno total y membranal (datos no mostrados), hacia estos mismos antígenos (AgT y AgM), resultó ser altamente heterógena (Fig 5). Dentro del rango de antígenos de 30 a 200 kDa las reacciones de mayor intensidad se observaron con cinco antígenos de pesos moleculares 30, 46, 66, 104 y 127 kDa (Fig 5).

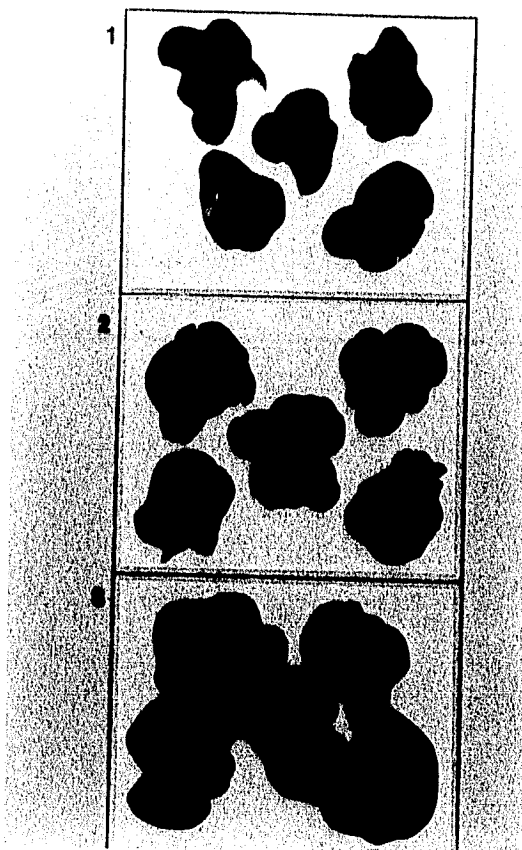


Fig 4. Fotografía de los hígados de los animales previamente inmunizados con los antígenos total (1), membranal (2) y solución salina (3), en la cual se puede observar el grado de protección conferido después de ser inoculados con 1.5×10^5 trofozoitos *E. histolytica*.

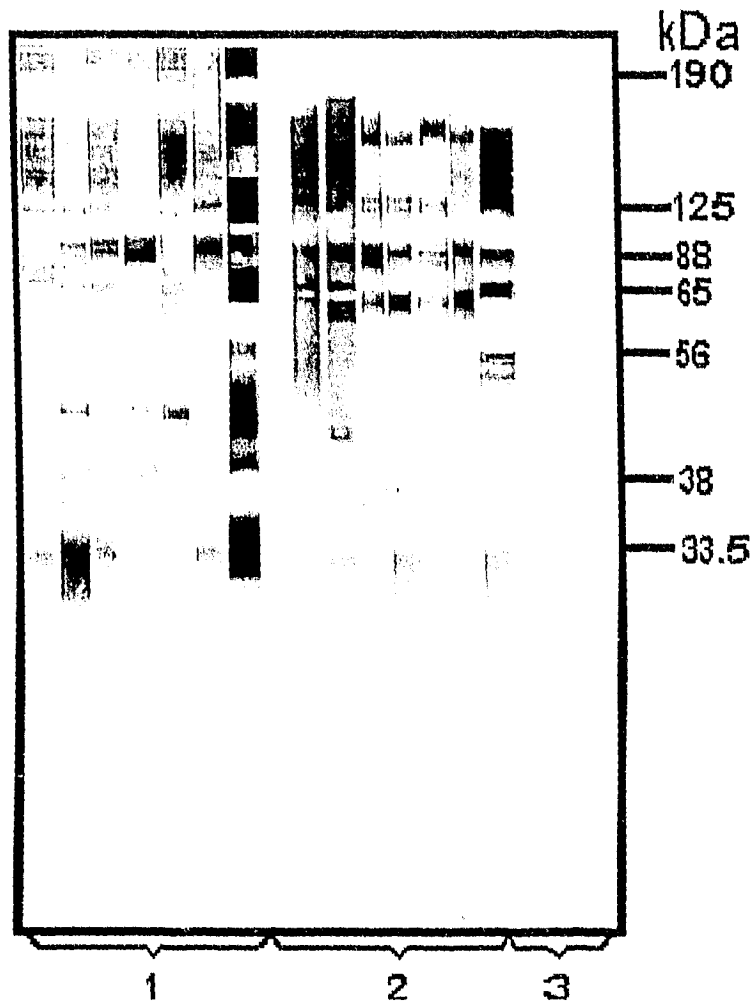


Fig 5. Reactividad de los sueros de los animales que mostraron protección a través de la inmunización con el antígeno total, hacia los antígenos total y membranal, la cual fue determinada por inmunotransferencia. 1) antígeno total, 2) antígeno membranal y 3) sueros con controles.

Tomando en cuenta tanto los resultados de protección observados en el experimento anterior (Fig 4), así como las evidencias de que existe una estrecha relación entre la antigenicidad e inmunogenicidad de la *E. histolytica* con los antígenos de mediano y alto peso molecular (57-61), se decidió trabajar con la fracción de 50 a 200 kDa del antígeno total (Fig 6), la cual está comprendida dentro de la fracción que mostró mayor reactividad a los sueros de los animales que fueron protegidos después de la inmunización con el antígeno total (Fig 5). Esta fracción fue purificada por electroelución a partir de geles de poliacrilamida (ver material y métodos corrimiento electroforético). En la Tabla 2 y Fig 7 se muestran los resultados del grado de protección conferido por esta fracción electroeluida (grupo Ib), así como los resultados obtenidos para el grupo IIb (antígeno total) y el grupo IIIb (control).

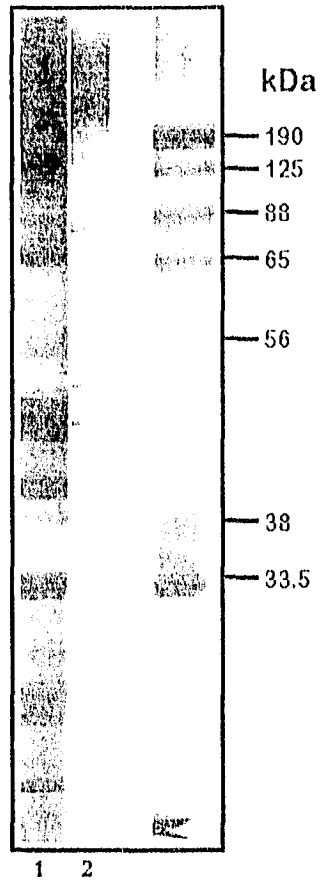


Fig 6. Patrón electroforético de la fracción electroeluida denominada Fel, 1) antígeno total, 2) fracción eluida (Fel) y 3) pesos moleculares obtenida en geles de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones no reductoras. Teñidos con azul de coomassie

Tabla 2. Determinación del grado de protección conferido por la fracción electrocluida en relación al antígeno total de *E. histolytica*.

GRUPO*	MATERIAL DE INMUNIZACION	% DE PROTECCION
Ib	Fe I	88 ±3
IIb	AgT	92 ±4
IIIb	CONTROL	27 ±5

* Todos los grupos estan conformados por 15 hamsters hembras de 4 semanas.

Grupo Ib vs Grupo IIIb $p < .001$

Grupo IIb vs Grupo IIIb $p < .001$

Grupo Ib vs Grupo IIb p NS

En este experimento se pudo observar a través de la inmunotransferencia del antígeno total, que los sueros de los animales inmunizados con la fracción denominada FeI que comprende los antígenos de 50 a 150 kDa, mostraron una alta reactividad hacia los antígenos de 46, 66 y 125 kDa, y un menor reconocimiento de los antígenos de 25 y 30 kDa (Fig 8).

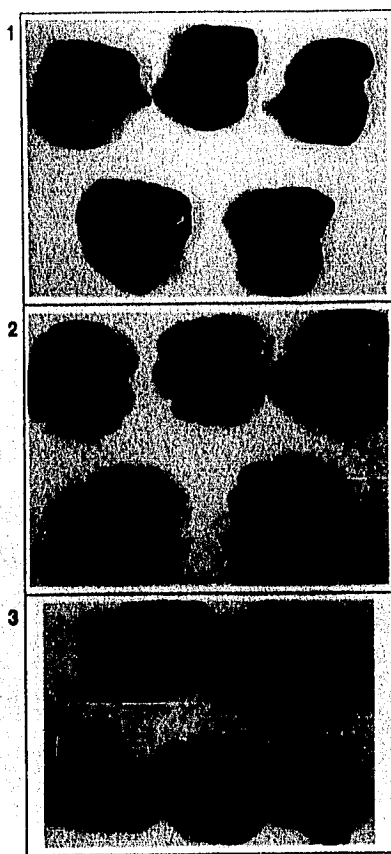


Fig 7. Fotografía de los hígados de los animales previamente inmunizados con los antígenos total (1), Fracción FeI (2) y solución salina (3), a las cuatro semanas después de ser inoculados con 1.5×10^5 trofozoitos *E. histolytica*.

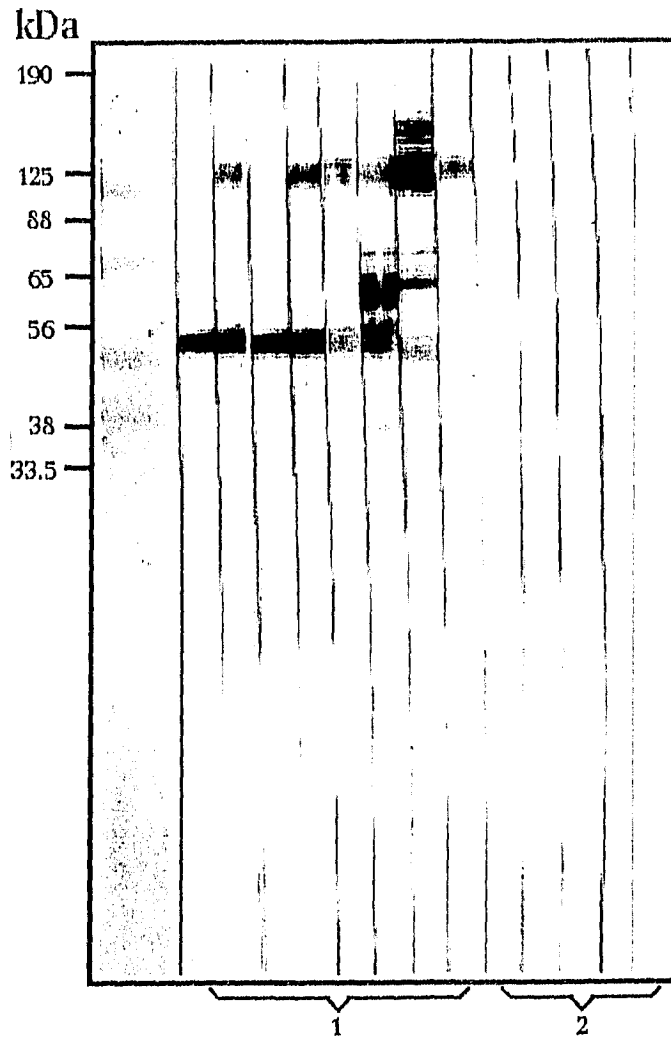


Fig 8. Respuesta mostrada por los sueros de los animales inmunizados con la fracción electroeluída FeI (50 a 200 kDa), hacia el antígeno total transferido. PM (pesos moleculares teñidos con amido Black, 1) sueros de animales inmunizados con FeI y 2) sueros de animales con solución salina (controles). Carriles 1-2 revelados con 1-4 cloronaftol.

Después de identificar a las proteínas del antígeno total de *E. histolytica* que mostraron mayor reactividad por los sueros de los animales inmunizados con la fracción electroeluida I (FeI)(Fig 8), mediante inmunotransferencia, decidimos trabajar con la mezcla de los antígenos de 46, 66 y 125 kDa (Fig 9), con el objeto de determinar si estos antígenos son los responsables directos en la inducción de la respuesta protectora observada en nuestros experimentos previos (Figs. 4 y 7).

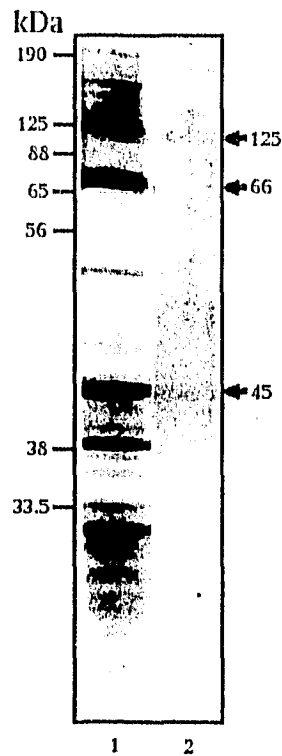


Fig 9. Patrón electroforético mostrado por la fracción denominada FeI en geles de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones no reductoras mediante tinción con azul de Coomassie. 1) antígeno total y 2) fracción electroeluida II (FeII).

Los resultados obtenidos después de inmunizar a los animales con la fracción electroeluida FeII (Grupo Ic) en relación con los resultados obtenidos para los animales que fueron inmunizados con el antígeno total (Grupo IIc), no mostraron diferencias estadísticamente significativas, ya que para ambos casos, el grado de protección fue mayor al 90%, pero si se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre los resultados obtenidos para estos dos grupos (Ic y IIc) y el grupo control (Grupo IIIc), al cual solo se le administro solución salina (Tabla 3 y Fig 10).

En la figura 11, se puede observar que los sueros de los animales inmunizados con la fracción FeII (número 3), muestran un marcado reconocimiento de los antígenos de 46, 66 y 125 kDa, en el antígeno total transferido; así mismo, la respuesta de los sueros de los animales inmunizados con el antígeno total (número 2) hacia estas proteínas se hace evidente entre otras.

Tabla 3. Determinación del grado de protección conferido por la fracción electroeluida denominada (FeII) en comparación con el obtenido con el AgT de *E. histolytica*.

GRUPO*	MATERIAL DE INMUNIZACION	% DE PROTECCION
Ic	Fe II	91 ±4
IIc	AgT	94 ±3
IIIc	CONTROL	33 ±4

* Todos los grupos están conformados por 10 hámsters hembras de 4 semanas.

Ic vs IIIc $p < .001$

IIc vs IIIc $p < .001$

Ic vs IIc p NS

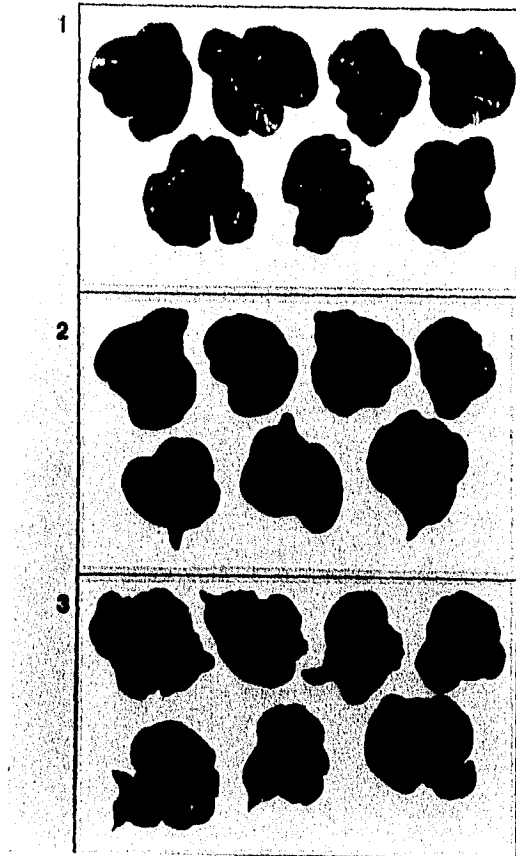


Fig 10. Fotografía de los hígados de los animales previamente inmunizados con los antígenos (1) total, (2) Fracción FeII y (3) solución salina a las cuatro semanas de ser inoculados con 1.5×10^5 trofozoitos de *E. histolytica*.

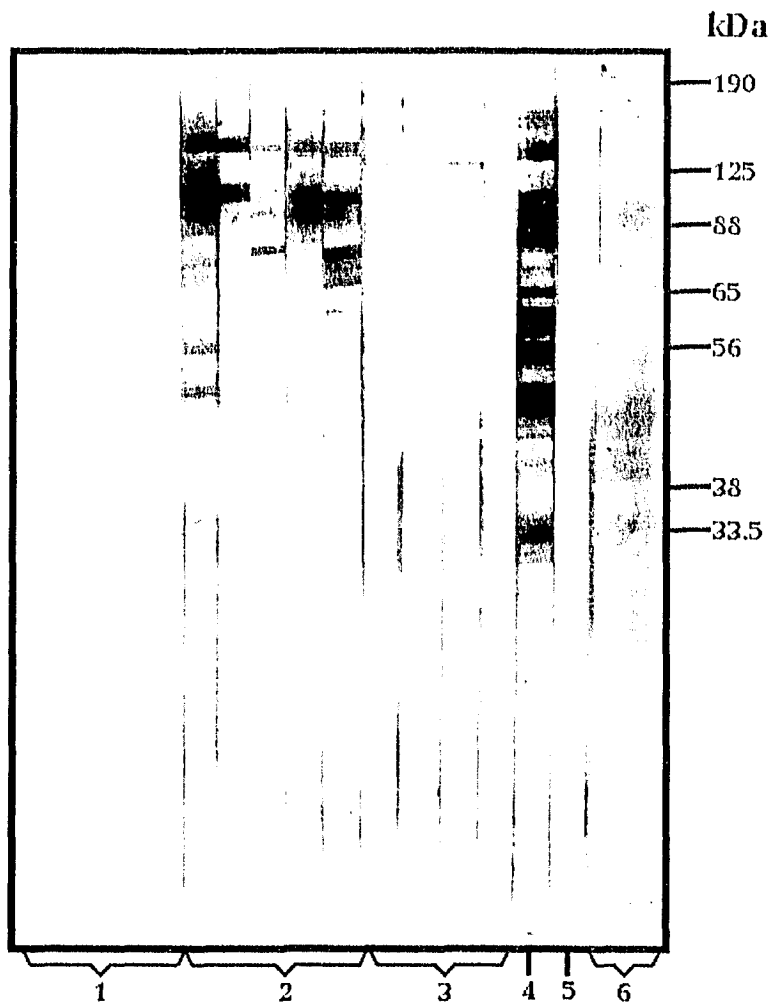


Fig 11. Reactividad de los sueros de los animales inmunizados con antígeno total y fracción electroeluida II (Fell), hacia el antígeno total por la técnica de inmunotransferencia. 1) animales grupo control (solución salina), 2) suero de animales inmunizados con antígeno total, 3) sueros de animales inmunizados con la fracción electroeluida (Fell), 4) suero anti-AHA (control positivo), 5) control de reactivos y 6) antígeno total teñido con amido black.

DISCUSION

Hasta el momento existen pocos reportes referentes a la caracterización de los antígenos amibianos que por su participación directa en la relación huésped-parásito son biológicamente importantes. Sin embargo, es conocido el hecho de que los componentes superficiales de la amiba participan de manera importante tanto en el proceso infeccioso como en la inducción de inmunidad residual^(37,38).

En este trabajo se lograron identificar tres antígenos de superficie de *E. histolytica* con pesos moleculares de (46, 66 y 125 kDa)⁽⁶¹⁾, los cuales mostraron ser conjuntamente capaces de inducir inmunidad protectora en el modelo experimental de amibiasis hepática en hámster (> 90% de protección).

Mediante análisis por inmunoelectrotransferencia utilizando sueros de pacientes con amibiasis invasiva, se ha mostrado que la proteína membranal rica en cisteína de 29-30 kDa induce una respuesta humoral específica y diferencial que correlaciona con los distintos estadios de evolución de la infección amibiana, encontrándose en general una respuesta elevada de anticuerpos en pacientes con absceso hepático amibiano y niveles bajos de anticuerpos en portadores asintomáticos. Además la expresión de esta proteína correlaciona con el potencial invasivo del parásito⁽³⁷⁾; así mismo, se ha demostrado en sistemas *in vitro* que ésta

proteína está involucrada en los procesos de citotoxicidad de los trofozoitos a las células blanco⁽⁶²⁾.

En nuestros ensayos, la proteína de 29 kDa fue ampliamente reconocida (fig.5) por la mayoría de los sueros de los hámsters protegidos mediante la inmunización con el antígeno total.

Stanley y col (1991), analizaron la reactividad en el humano de la proteína rica en serina de 46-52 kDa observando que en los 108 sueros inmunes, existe un reconocimiento del 82% en pacientes con amibiasis invasiva, mostrando una especificidad del 95% en el análisis. Este mismo grupo, demostró posteriormente mediante ensayos *in vitro* que esta proteína juega un papel muy importante en la adherencia de los trofozoitos de *E. histolytica* a las células CHO, ya que antisueros dirigidos contra esta proteína rica en serina, fueron capaces de inhibir la adhesión de la amiba a la célula blanco en un 70%⁽⁶³⁾. En nuestro modelo experimental además de que esta proteína mostró ser altamente inmunogénica parece participar directamente en la inducción de protección.

Así mismo, en 1991 Martínez Palomo y Espinosa reportaron que el 73% de los sueros de pacientes con absceso hepático amibiano reconocen una proteína de 125 kDa, de la cual recientemente se ha clonado el gen y se ha expresado un fragmento de 470 aa, el cual ha sido utilizado en un ensayo tipo ELISA para inmunodiagnóstico

de la amibiasis invasiva, observando un 100% de especificidad y sensibilidad de la prueba en sueros de pacientes con absceso hepático amibiano⁽⁶⁴⁾.

Tanich y col (1991) han analizado patrones de restricción del gen que codifica para esta proteína, observando que éstos patrones fueron diferentes en tre cepas patógenas y no patógenas⁽⁶⁵⁾. La participación del antígeno de 125 kDa en la inducción de protección en nuestros experimentos fue importante, ya que cuando se evaluó el grado de prevención del AHA utilizando las diferentes proteínas amibianas de manera conjunta e individual (datos no mostrados), la ausencia de la misma disminuía el efecto protector.

Por otro lado, recientemente se ha demostrado la presencia de determinantes antigénicos compartidos entre algunos componentes del citosól y de la membrana^(64,55,60) de *E. histolytica*, observando que no únicamente los antígenos superficiales han mostrado ser buenos inmunógenos en una respuesta inmune contra la amiba. Estos hallazgos podrían explicar la elevada homología que observamos en las inmunotransferencias utilizando los sueros de los hárnsters protegidos con el antígeno total cuando se hicieron reaccionar con las fracciones membranar y total (fig 5).

Se han utilizado diferentes fracciones de la amiba (citósólica, membranar, total) con el objeto de inducir protección en diferentes modelos experimentales ; a la

fecha existen numerosos grupos preocupados en la caracterización y evaluación de estos extractos (crudos, parcialmente purificados o en algunas ocasiones utilizando antígenos purificados) en la inducción de una inmunidad protectora contra *E. histolytica*^(36-41,43).

Vinayak y col (1980), lograron obtener mediante cromatografía de filtración (Sephadex G 200 o Sephacry S-300) diferentes fracciones semipurificadas de *E. histolytica* de las cuales, la fracción que contiene una mezcla de proteínas que presentan pesos moleculares entre 50 y 200 kDa, mostró la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora en cobayos. Las fracciones que obtuvimos mediante electroelución y que denominamos FeI (50-200 kDa) y FeII (46,65 y 125 kDa) y que mostraron un alto grado de protección en nuestro modelo experimental, al parecer se encuentran dentro del rango de pesos moleculares encontrados por Vinayak y col. (1980). En nuestros experimentos pudimos observar una elevada reactividad en los sueros de los hámsters protegidos con esta fracción (50-200 kDa), hacia los antígenos de 46,65 y 125 kDa, los cuales proponemos que en forma conjunta tengan participación directa no solo en la inducción de inmunidad, sino en la protección contra el parásito.

Por otro lado, se pudo advertir la naturaleza glicoprotéica de los antígenos que conforman la fracciones electroeluidas FeI y FeII, mediante análisis de tinción de glicoproteínas (datos no mostrados). Al respecto es conocido el hecho de que el

contenido de azúcares de las proteínas de superficie de la amiba es diferente en las distintas cepas de *E. histolytica*, principalmente en cuanto al contenido de manosa⁽⁶⁵⁾. Al parecer los residuos de manosa están involucrados en los sistemas de reconocimiento celular así como en la virulencia de las cepas^(66,67). Sin embargo, ya no fue posible llevar más allá nuestro análisis de caracterización de éstos antígenos.

Finalmente cabe mencionar que, aunque el grado de protección conferido por las fracciones electroeluidas Fel y Fell en el modelo de AHA en hámster fue estadísticamente significativo y similar a evaluaciones llevadas a cabo por otros grupos de investigación⁽³⁶⁻⁴¹⁾, tanto el empleo de diferentes modelos animales (gerbos, ratón, hámster, etc) en donde la susceptibilidad a la infección por el parásito y la resistencia innata pudieran ser diferentes así como el uso de distintos aislados del parásito, pueden ser factores que compliquen la interpretación conjunta de los diversos hallazgos experimentales para el potencial uso de estos antígenos en la profilaxis de la amibiasis.

En base al alto grado de protección conferido mediante la inmunización con la fracción membranal del antígeno amibiano (>90%), así como con las proteínas de 46,65 y 125 kDa y su correlación clara con la respuesta de anticuerpos específicos en el suero de los animales tratados, sugerimos que la asociación de estas proteínas pudiera ser potencialmente útil en la profilaxis de la infección por *E. histolytica*.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- World Health Organization (1969) Amoebiasis. Report of a WHO expert committee. WHO Tech. Rep. Ser. 4121: 1.
- 2.- Rubin E. and Farber J. (1990) Amebiasis (*Entamoeba Histolytica*). In: Infectious and parasitic diseases. Pathology. 414.
- 3.- Guerrant R. (1986) The global problem of amebiasis: current status, research need, and opportunities for progress. Introduction, current status and research questions. Rev. Infect. Dis. 8: 218.
- 4.- Gutierrez G., Ludlow A., Espinosa G., Herrera S., Muñoz O., Rattoni N., and Sepúlveda, B. (1976) National serologic survey, II Search for antibodies against *Entamoeba histolytica* in México. In: Sepúlveda, B., Diamond, L. eds.: Proceedings of the International Conference on Amebiasis. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F. 609.
- 5.- Martínez Palomo A. y Martínez B. (1983) Amibiasis. Sal. Púb. Méx. 25: 563.
- 6.- Warren K. (1988) Foreword in Amebiasis. Human Infection by *Entamoeba histolytica*. John Wiley and Sons, New York.
- 7.- Sistema Nacional de Salud. (1993) Boletín Mensual de Epidemiología. 8(11): 172.
- 8.- González G. y Gutiérrez G. (1986) Reducción de la letalidad por absceso hepático amibiano. Experiencia de un hospital pediátrico Mexicano. Arch. Invest. Méd. (México) 17(Supl. 1): 341.
- 9.- Lee R. y González M. (1970) Pronóstico en la amibiasis invasora del hígado. Arch Invest Med (Méx) 1 (Supl.): s199.
- 10.- Serafín F., Catañeda E., Díaz S., Palacios O. y Gutiérrez G. (1980) Evaluación diagnóstica y terapéutica en la amibiasis intestinal invasora del niño. Arch. Invest. Méd. (México) 11 (Supl. 1): 291.
- 11.-Gutiérrez G. (1986) Epidemiología y control de la amibiasis en México. Arch. Invest. Méd. (México) 17 (Supl.1): 375.
- 12.-Lushbaugh W. and Miller J. (1974) Fine structural topochemistry of *Entamoeba histolytica* Schaudinn. J. Parasitol. 60: 421.

- 13.-Stern J., Graybill J., and Drutz D. (1984) Murine amebiasis: the role of the macrophage in host defense. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 372.
- 14.-Sharma A., Haq A., Ahmad S., and Lederer E. (1985) Vaccination of rabbits against *Entamoeba histolytica* with aqueous suspension of Trehalosa-Dimycolate as the adjuvant. *Infect. Immun.* 48: 634.
- 15.-Mattern C. and Keister D. (1977) Experimental amebiasis. I. Pathogenicity of axenically cultured *Entamoeba histolytica* in the brain of the newborn mouse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26(3): 393.
- 16.-Ghadirian E. and Meerovitch E. (1978) Vaccination against hepatic amoebiasis in hamsters. *J. Parasitol.* 64: 742.
- 17.-Thompson P. (1971) Experimental amebiasis and chemotherapy. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 2 (suppl. 1): 245.
- 18.-Diamond L., Phillips B., and Bartgis I. (1973). Virulence of axenically cultivated *E. histolytica* *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 4 (suppl. 1): 99.
- 19.-Diamond L., Phillips B., and Bartgis I. (1974) A comparison of the virulence of nine strains of axenically cultivated *E. histolytica* in the hamster liver. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 5 (suppl. 2): 423.
- 20.-Tanimoto-Weki M., Vásquez S., Calderon-Lara P. y Aguirre-García. (1973) Resultados de la inoculación al hámster de trofozoítos obtenidos de portadores asintómicos de *E. histolytica* *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 4 (Supl.1): 105.
- 21.-Mattern C. and Keister D. (1977). Experimental Amebiasis. II. Hepatic amebiasis in the Newborn Hamster. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 402.
- 22.-Pérez-Tamayo R., Dario M., Montfort I., Becker I., Tello E. and Pérez-Montfort, R. (1991) Pathogenesis of acute experimental amebic liver abscess in hamster. *J. Parasitol.* 77(6): 982.
- 23.-Kretschmer R. (1984) Immune phenomena in amebiasis. *Surv. Immunol. Res.* 3:1.
- 24.-Sepúlveda B. and Martínez Palomo A. (1982) Immunology of amoebiasis produced by *Entamoeba histolytica*. In: Cohen S. and Warren K. Eds *Immunology of Parasitic Infections*. 2a. ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 170.

- 25.-Norman L., Gold D., and Kagan I. (1979) The serologic response of hamsters to experimental liver inoculation with *Entamoeba histolytica* as measured by indirect hemmagglutination test and enzyme linked immunoabsorbent assay. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28: 198.
- 26.-Lin T., Halbert S., Chiu C., and Zarco R. (1981) Simple standardized enzyme-linked immunoabsorbent assay for human antibodies to *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Microbiol. 13: 646.
- 27.-Gandhi B., Irshad M., and Chawla T. (1987) Enzyme linked protein-A, an ELISA for detection of amoebic antibody. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81: 183.
- 28.-Ungar B., Yolken R., and Quinn T. (1985) The use monoclonal antibody in an enzyme immunoassay for the detection of *Entamoeba histolytica* in fecal specimens. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34: 465.
- 29.-Segupta K., Das P., Johnson T., Chaudhuri P., Das D., and Nair G., (1993) Production and characterization of monoclonal antibodies against a highly immunogenic fraction of *Entamoeba histolytica*(NIH:200) and their application in the detection of current amoebic infection. J. Eukaryot. Microbiol. 40(6): 722.
- 30.-Diamond L., Harlow D., and Cunnick C. (1978) A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 431.
- 31.-Thomson P., Gradel S., Schneider C., Stuki W., and Gordon R. (1968) Preparation and evaluation of standardized amoeba antigen from axenic culture of *Entamoeba histolytica*. Bull WHO 39: 349.
- 32.-Ximénez C., Sosa O., Leyva O., Morán P., and Melendro E. (1992) Western blot of *Entamoeba histolytica* antigenic fractions: reactivity analysis with sera from intestinal amoebiasis patients. Ann. Trop. Med. Parasitol. 86(2): 121.
- 33.-Myung K., Burch D., Jackson T., and Stanley S. jr. (1992) Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen-based ELISA. Arch. Med. Res. 23(2): 285.
- 34.-Torian B., Lukehart S., and Stamm W. (1987) Use of monoclonal antibodies to identify, characterize, and purify a 96,000-Dalton surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. J. Infect Dis. 156(2):535.
- 35.-Ghadirian E. and Meerovitch E. (1978) Vaccination against hepatic amebiasis in hamsters. J. Parasitol. 64(4): 742.

- 35.-Vinayak V., Sawhney S., Jain P., and Chakravarti R. (1980) Protective effects of crude and chromatographic fractions of axenic *Entamoeba histolytica* in guinea-pigs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74(4): 483.
- 37.-Tanimoto-Weki M., Aguirre-García J., Sánchez M. y Sepúlveda G. (1986) Inducción de inmunidad protectora antiamebiana en el hámster por medio de antígeno soluble deslipidizado. *Arch. Invest. Méd. (Méx)* 17 (Supl.):233.
- 38.-Chugh P., Nain C., and Vinayak V. (1987) Induction of protective immunity to experimental hepatic amoebic infection in hamsters. *J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol.* 31(1): 99.
- 39.-Nain C. and Vinayak V. (1987) Vaccination against experimental hepatic amoebic infection and evaluation of phosphatidylcholine liposomes as immunopotentiator. *J. Parasitol.* 73(4): 859.
- 40.-Petri W. and Ravdin J. (1991) Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 97: 101.
- 41.-Das P., Segupta K., Pal S., Das D., and Pal SC. (1993) Biochemical and immunological studies on soluble antigens of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.* 79: 365.
- 42.-Zhang T., Cieslak P., Samuel L., and Stanley J. (1994) Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infect. Immun.* 29: 1166.
- 43.-Parkhouse M., Cid M. y Calderon J. (1978) Identificación de antígenos de membrana de *E. histolytica* con anticuerpos de pacientes con amibiasis. *Arch. Invest. Méd. (Méx)* 9 (Supl.1): 211.
- 44.-Ramwan J. and Mishra R. (1986) Purification of bovine striatal dopamine D-2 receptor by affinity Chromatography. *J. Biol. Chem.* 261: 8894.
- 45.-Lowry O., Rosebrough M., Farr A., and Randall R. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- 46.-Ouchterlony Ö. (1958) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy* 5 : 1.
- 47.-Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680.

- 48.-Towbin H., Strackelin T., and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350.
- 49.-Norman L., Gold D., Maddison S., and Kagan I. (1978) Immunologic studies on hamsters infected with *Entamoeba histolytica* *J. Parasitol.* 64(5): 866.
- 50.-Acosta V., Muñoz M. y Calderon J. (1978) Caracterización de moléculas superficiales de *Entamoeba invadens* *Arch. Invest. Méd. (Méx)* 9 (Supl. 1): 175.
- 51.-Rivas P., Carabez-Trejo A., Cortes L., Isibasi A., and Kumate J. (1984) Caracterización inmunoquímica de antígenos propios y del medio de cultivo en la membrana plasmática de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx)* 15 (Supl. 2): 405.
- 52.-Garvey J., Cremer N., and Dieter H. (1977) Section III. Preparation of antiserums. *Methods in Immunology*. 3er. ed. Academic Press, Inc. 196.
- 53.-Aley S., Scott W., and Cohn A. (1980) Plasma membrane of *Entamoeba histolytica* *J. Exp. Med.* 152: 391.
- 54.-Aust-Kettis., Thorstensson R., and Utter G. (1983) Antigenicity of *Entamoeba histolytica* strain NIH 200: a survey of clinically relevant antigenic components. *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 32: 512.
- 55.-Ali Khan Z. and Meerovitch E. (1970) Studies on the purification of *Entamoeba histolytica* antigen by gel filtration. II. The antigenic properties of the isolated fraction. *Can. J. Microbiol.* 16: 439.
- 56.-Krupp I. (1977) Definition of the antigenic pattern of *Entamoeba histolytica* and immunoelectrophoretic analysis of the variation of the patient response to amebic disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 387.
- 57.-Das S., Kidwai S., and Gupta A. (1979) Preparation of standard amoeba antigen from axenic *Entamoeba histolytica* and its use in serodiagnosis and seroepidemiology of amoebiasis. *J. Biosci.* 1: 255.
- 58.-Sawhney S., Chakraborti R., Jain P., and Vinayak V. (1980) Immunogenicity of axenic *Entamoeba histolytica* antigen and its fractions. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74: 26.
- 59.-Mathews H., Moss D., and Visvesvara G. (1986) Analysis of antigens from membrane and soluble fractions of *Entamoeba histolytica* *J. Protozool.* 33: 328.

- 60.-Mann B. and Petri W. Jr. (1991) Cell surface proteins of *Entamoeba histolytica*. Parasitol. Today 7: 173.
- 61.-Vinayak V., Shandil R., and Kaur U. (1991) Monoclonal antibodies which inhibit in vitro cytotoxicity of axenic *Entamoeba histolytica* Indian J. Med. Res. (A)93: 311.
- 62.- Stanley S. Jr. (1991) Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. JAMA 266(14): 1984.
- 63.-Edman U., Meraz M., Rausser S., Agabian N., and Meza J. (1990) Characterization of an immunodominant soluble surface antigen from pathogenic and non pathogenic *E. histolytica* J. Exp. Med. 172: 879.
- 64.-Tannich E. and Burchard G. (1991) Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. J. Clin. Microbiol. 29: 250.
- 65.-Trissl D., Martínez Palomo A., Argüello C, de la Torre M., and de la Hoz R. (1977) Surface properties related to concavalin A-induced agglutination. A comparative study of several *Entamoeba* strains. J. Exp. Med. 145: 52.
- 66.-de la Torre P. (1992) Caracterización antigénica de *Entamoeba histolytica*. Tesis. UNAM.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
 INSTITUTO DE QUÍMICA