

302827

1



UNIVERSIDAD MOTOLINIA

ESCUELA DE QUIMICA

Incorporada a la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

"INVESTIGACION DE LOS ANTIGENOS EN DIFERENTES CEPAS DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS"

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

LEONEL ESTRADA LORENZO

México, D. F.

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Dedico este trabajo a:

MIS PADRES:

Leonel Estrada León
María Belem Lorenzo de Estrada.

A LA MEMORIA DE MI ABUELITA.

Sra. Catalina Morales Vda. de Lorenzo

A MIS HERMANOS:

Martha Catalina Estrada Lorenzo
Elena Estrada Lorenzo
Adrián Estrada Lorenzo
Manuel Jesús Estrada Lorenzo

A MI SOBRINO:

Rodolfo Fabián Landeros Estrada.

AGRADECIMIENTOS

Con profunda admiración y respeto a la Dra. Enedina Jiménez Cardoso a quien le agradezco encarecidamente por cada uno de sus sabios-consejos en la dirección de esta-investigación y quien me brindó - el apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Pedro Francisco Valencia-Mayoral quien desinteresadamente realizó la investigación sobre - Patología de este trabajo.

Al HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO por haberme permitido realizar este estudio de investigación.

Al Q.F.B. Arturo Menesses Castañón por haber colaborado en la revisión de este trabajo.

INDICE

- 1.0.- GENERALIDADES.
- 2.0.- INTRODUCCION.
- 3.0.- ABREVIATURAS.
- 4.0.- MATERIAL.
 - 4.1.- Equipo y material de vidrio.
 - 4.2.- Material biológico.
 - 4.2.1.- Cepas de Entamoeba Histolytica.
 - 4.2.2.- Animales de experimentación.
 - 4.2.3.- Sueros de pacientes con absceso hepático amibiano.
- 5.0.- METODO.
 - 5.1.- Cultivo axénico de Entamoeba histolytica.
 - 5.1.1.- Caldo nutritivo TY.
 - 5.1.2.- Solución de vitaminas y Tween 80.
 - 5.1.3.- Preparación del medio de cultivo - - TYI-S-33.
 - 5.1.4.- Pruebas de esterilidad.
 - 5.1.5.- Inoculación de los trofozoitos al medio de cultivo TYI-S-33.
 - 5.1.6.- Recolección, lavado y determinación - de la viabilidad de los trofozoitos - mediante la técnica de exclusión con azul tripano.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2

- 5.2.- Cálculo del número total de trofozoitos.
- 5.3.- Obtención y separación de las proteínas en - las cinco cepas de amibas estudiadas mediante centrifugación diferencial.
 - 5.3.1.- Empleo de inhibidores enzimáticos.
 - 5.3.2.- Homogenización.
 - 5.3.3.- Centrifugación diferencial en la sepa ración de las proteínas.
- 5.4.- Purificación parcial de las proteínas utili-- zando una columna de Ultrogel ACA-44.
 - 5.4.1.- Concentración de las proteínas.
 - 5.4.2.- Cromatografía en columna sobre - - ULTROGEL ACA-44.
 - 5.4.3.- Diálisis de las proteínas obtenidas.
 - 5.4.4.- Liofilización de las proteínas obteni das.
- 5.5.- Investigación de la actividad biológica de - las fracciones proteicas en las cinco cepas - de amibas estudiadas frente a sueros de pa- - cientes con absceso hepático amibiano y/o co- litis amibiana mediante la técnica de hemaglu tinación pasiva.
 - 5.5.1.- Solución de alsevers.
 - 5.5.2.- Suspensión de glóbulos rojos de carne ro.
 - 5.5.3.- Preparación del antígeno.

- 5.5.4.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 7.2.
 - 5.5.4.1.- Solución de fosfato de potasio monobásico 0.15 M.
 - 5.5.4.2.- Solución de fosfato de sodio dibásico 0.15 M.
- 5.5.5.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4.
 - 5.5.5.1.- Solución de fosfato de potasio monobásico 0.15 M.
 - 5.5.5.2.- Solución de fosfato de sodio dibásico 0.15 M.
- 5.5.6.- Solución de ácido tánico al 1%.
- 5.5.7.- Suero de conejo normal inactivado a -56°C.
- 5.5.8.- Adsorción de los glóbulos rojos de carnero con las fracciones proteicas.
- 5.6.- Investigación de la actividad biológica de las fracciones proteicas en las cinco cepas de amibas estudiadas frente a sueros obtenidos de los hámsters inmunizados mediante la técnica de hemaglutinación pasiva.
 - 5.6.1.- Solución de alsevers.
 - 5.6.2.- Suspensión de glóbulos rojos de carnero.
 - 5.6.3.- Preparación del antígeno.

- 5.6.4.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 7.2.
 - 5.6.4.1.- Solución de fosfato de potasio monobásico 0.15 M.
 - 5.6.4.2.- Solución de fosfato de sodio dibásico 0.15 M.
- 5.6.5.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4.
 - 5.6.5.1.- Solución de fosfato de potasio monobásico 0.15 M.
 - 5.6.5.2.- Solución de fosfato de sodio dibásico 0.15 M.
- 5.6.6.- Solución de ácido tánico al 1%.
- 5.6.7.- Suero de conejo normal inactivado a -56°C.
- 5.6.8.- Adsorción de los glóbulos rojos de carnero con las fracciones proteicas.
- 5.7.- Investigación de la actividad protectora de las fracciones proteicas obtenidas en las diferentes cepas de amibas en el hámster dorado de Siria.
 - 5.7.1.- Inmunización.
 - 5.7.2.- Desafío intrahepático.
 - 5.7.3.- Sacrificio de los animales inoculados.
- 5.8.- Estudio histopatológico de las lesiones observadas en el hígado de los animales inoculados.

5.8.1.- Preparación de los tejidos.

5.8.2.- Procesado de los tejidos.

5.8.2.1.- Deshidratación, aclaramien-
to e inclusión.

5.8.3.- Tinción de hematoxilina-eosina.

5.8.4.- Observaciones microscópicas.

6.0.- RESULTADOS.

7.0.- DISCUSION.

8.0.- CONCLUSIONES.

9.0.- BIBLIOGRAFIA.

1.0.- GENERALIDADES.

La alta frecuencia de la amibiasis en la población mundial hace que ésta ocupe un lugar muy importante entre las principales enfermedades que afectan al hombre. (6, 7 y 10).

Su distribución geográfica es amplia, pero su mayor incidencia no está en relación con la zona geográfica sino en las condiciones sanitarias en que viven los grupos humanos. (8, 19).

Las manifestaciones clínicas que produce Entamoeba histolytica son múltiples y a menudo graves en donde el estudio parasitológico y la selección del tratamiento es habitualmente inadecuado. (24).

Por otro lado no siempre la presencia del parásito es sinónimo de enfermedad (2, 3), ya que éste es morfológicamente indistinguible del agente causal de una amibiasis invasora. (4, 5 y 18).

Siendo el absceso hepático amibiano el único índice para juzgar la prevalencia de este padecimiento. (8).

En la terapéutica de la amibiasis el uso de anti-amibianos como el metronidazol ha reportado efectos carcinogénicos en donde en estudios realizados con ratas, Kreier (11) en 1978 demostró que el fármaco inducía la formación de tumores; fue por ello indispensable el utilizar métodos más apropiados para la erradicación de esta enfermedad que ocupa uno de los problemas de salud pública más importante para México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.0.- INTRODUCCION.

El aislamiento de antígenos de Entamoeba histolytica tiene importancia, por la posibilidad de inducir inmunidad protectora en el huésped que interfiera con el desarrollo de la enfermedad producida por la presencia de este parásito así como de su invasividad al instalarse en el hígado donde causa el "absceso hepático-amibiano".

Krupp (12) en 1973 fue uno de los primeros investigadores quien demostró que es posible inducir inmunidad protectora en el cobayo adulto mediante la inyección de una fracción de antígeno amibiano.

Con el mismo propósito Arroyo-Begovich (1) en 1978 utilizó diferentes fracciones antigénicas de Entamoeba histolytica las que inoculó en animales de laboratorio logrando inducir la inmunidad protectora en ellos evitando la formación del absceso hepático amibiano.

Masood (13) en 1974 siguiendo una metodología similar determinó el grado de inmunogenicidad en dos fracciones proteicas obtenidas de Entamoeba histolytica así como la actividad biológica frente a sueros de pacientes con absceso hepático amibiano llegando a la conclusión que éstos podían ser utilizados para inducir inmunidad protectora en animales de laboratorio.

Recientemente se han descrito amibas de primates morfológicamente semejantes a Entamoeba histolytica diferenciando solamente en el patrón enzimático que presentan y que Sargeant (21, 17 y 23) ha establecido para las amibas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Myjak (15) en 1970 estudiando varias cepas de Entamoeba histolytica en Polonia, logró obtener antígenos compartidos entre ellas lo que nos indicó la posibilidad de que existan antígenos específicos para cada cepa y que éstos puedan ser utilizados en la inmunidad protectora.

El objetivo de este trabajo fue investigar si -- existen antígenos compartidos o específicos en cinco -- cepas diferentes de amibas en donde tres de ellas corresponden a Entamoeba histolytica y las dos últimas a Entamoeba chattoni e investigar si presentan actividad biológica frente a sueros de pacientes con absceso hepático amibiano lo que sugeriría que pudiesen ser utilizados como antígenos protectores en el hámster para prevenir la enfermedad así como la formación del absceso hepático amibiano.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.0.- ABREVIATURAS.-

- 1.- PM-4. Primate mexicano (4)
- 2.- PM-5. Primate mexicano (5)
- 3.- AHM-I Absceso hepático mexicano (1)
- 4.- HM-531 Homo-mexicano (531)
- 5.- HMI Homo-sapiens mexicano (1)
- 6.- EDTA. Etilen diamino tetraacético.
- 7.- FMSP. Fenil metil sulfonil fluoruro.
- 8.- g. gramo
- 9.- lb. libra
- 10.- ml. mililitro.
- 11.- mg. miligramo.
- 12.- mM milimolar
- 13.- M molar
- 14.- nm nanometros
- 15.- pp precipitado
- 16.- PBS. Solución salina reguladora de fos-
fatos 0.15 M. pH 7.0.
- 17.- S.A.M.I. Sin alteraciones macroscópicas de-
importancia.

4.0.- MATERIAL.

4.1.- Equipo y material de vidrio.

- 1.- Colector de fracciones LKB REDIRAC 2112.
- 2.- Columna para cromatografía LKB 2137-026.
- 3.- Fuente de poder LKB 2138 UVICORD S.
- 4.- Graficador LKB 2210-2.
- 5.- Lámpara de luz UV. LKB 90 011431.
- 6.- Liofilizadora FREEZE, DRYER 3, LABCONCO.
- 7.- Bomba peristáltica LKB 4912.
- 8.- Bomba para vacío.
- 9.- Cámara de Neubauer.
- 10.- Centrifuga SORVAL con refrigeración modelo - RC-5.
- 11.- Diálisis o Equipo de tamizado molecular.
- 12.- Espectrofotómetro Beckmann Modelo 26.
- 13.- Flujo laminar marca VECO.
- 14.- Homogenizador Potter-Elvehjem.
- 15.- Incubadora Medi-Lab Mark I No. 415.
- 16.- Balanza analítica P-115 Bosch.
- 17.- Centrifuga clínica Modelo C-I
- 18.- Micropipetas de 20, 10 y 50 microlitros de - "Sigma Chemical Company".

- 19.- Minicon B-15 Concentrator "Amicon corpora-
tion Lexington, Mass"
- 20.- Papel filtro Whatmann No. 1 cualitativo.
- 21.- Jeringa de vidrio de 20 ml.
- 22.- Agujas yale calibre 18 x 30 mm. desechables.
- 23.- Jeringas de insulina desechables.
- 24.- Pipetas pasteur.
- 25.- Potenciómetro Corning Modelo 5 pH meter.
- 26.- Ultracentrifuga Beckmann modelo L-2-65.
- 27.- Placas de hemaglutinación "Cooke Microtiter-
U".
- 28.- Matraces Erlenmeyer de 125 y 250 ml. con ta-
pón de rosca.
- 29.- Pipetas para glóbulos blancos.
- 30.- Tubos para centrifuga de plástico de 13 x -
110 mm.
- 31.- Tubos de 15 x 125 mm. con tapón de rosca.
- 32.- Tubos para ultracentrifuga de nitrato de ce-
lulosa de 13 x 50 mm.
- 33.- Tubos de 13 x 100 mm. de vidrio.
- 34.- Vasos de precipitados de 250 y 500 ml.
- 35.- Probetas de 100, 500 y 1000 ml de vidrio.
- 36.- Refrigerador marca Whirlpool.

4.2.- Material biológico.

4.2.1.- Cepas de Entamoeba histolytica.

Se utilizaron cinco cepas de amibas: Entamoeba chattoni cepa PM-4 y la cepa - PM-5; Entamoeba histolytica cepa AHM-I, - HMI-IMSS Zimodemo II y la cepa HM-531 Zimodemo hartmanni.

4.2.2.- Animales de experimentación.

Se emplearon hámsters dorados de - Siria, machos, con un peso promedio de - 50 a 60 g. y de dos meses de edad de los cuales se hicieron lotes de seis animales mediante números aleatorios.

4.2.3.- Sueros de pacientes con Absceso hepático amibiano y/o colitis amibiana.

Se tomaron diecisiete sueros de - - absceso hepático amibiano y/o colitis - amibiana para investigar su actividad biológica frente a las fracciones proteicas obtenidas de las cinco cepas de amibas estudiadas. Estos sueros fueron donados por el Hospital de Infectología del Centro Médico "La Raza", IMSS.

S.O.- METODO.-

5.1.- Cultivo axénico de Entamoeba histolytica.

Para el cultivo axénico de Entamoeba histolytica, se utilizó el medio de cultivo TYI-S-33, el cual está constituido de las siguientes soluciones:

5.1.1.- Caldo nutritivo TY.

Tripticasa - - - - -	2.0 g.
Extracto de levadura - - - -	1.0 g.
Glucosa - - - - -	1.0 g.
Cloruro de sodio - - - - -	0.200 g.
Fosfato de potasio monobásico - - - - -	0.050 g.
Fosfato de potasio dibásico-	0.100 g.
Acido L-Ascórbico - - - - -	0.020 g.
Clorhidrato de L-cisteína-monohidratada - - - - -	0.100 g.
Citrato de amonio férrico- -	22.800 mg
Llevar con agua destilada- -	87.0 ml.

PROCEDIMIENTO:

Se disolvieron los reactivos en el orden - presentado con aproximadamente 50.0 ml de agua - destilada, se ajustó el pH a 6.8 con hidróxido - de sodio 0.1 M. y después se llevó a un volumen - de 87.0 ml con agua destilada. El medio TY fue - clarificado mediante filtración a través de pa - pel Whatmann No. 1 y se esterilizó en autoclave - a 121°C. Debido a la gran cantidad de trofozoi - tos que se necesitaron, se prepararon 870.0 ml - de caldo que corresponden a 10 partes del medio - TYI-S-33 y en seguida se depositaron en matraces Erlenmeyer de 125.0 ml, 87.0 ml de caldo para ca - da matraz. Este paso se hizo en condiciones es - tériles con la ayuda del flujo laminar marca "VE CO", el caldo se dejó en una incubadora a 37°C. - durante 24 horas sin desarrollo de gérmenes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.1.2.- Solución de vitaminas y Tween 80.

- a).- Solución vitamínica Diamond s TPS-I 40 x.
- b).- Vitamina B₁₂.- Se pesaron 40 mg. de vitamina B₁₂ y se disolvieron en 100 ml de agua destilada, esta solución se almacenó en un frasco ámbar a 4°C.
- c).- Acido tióctico al 1.0 mg/ml. Se pesaron 100 mg. de ácido tióctico y se disolvieron en 100 ml de alcohol absoluto.
- d).- Tween 80 al 50 %. Se pesaron 50 mg- de Tween 80 y se disolvieron en 10-ml de alcohol absoluto.

"CASA BIOFLUIDOS INC. E.U.A.".

PROCEDIMIENTO:

A 100 ml de solución (a), se le adicionaron 12 ml de la solución (b), 40 ml de la solución (c), 4 ml de la solución (d) y 180 ml de agua destilada.

Esta solución se esterilizó mediante un filtro milipore, con una membrana de 0.22 micras, y se colocó en pequeños frascos ámbar a 4°C.

5.1.3.- Preparación del medio de cultivo TYI-S-33.

PROCEDIMIENTO:

Para cada 87.0 ml de caldo TY, se adicionaron en condiciones estériles, - 3.0 ml de la mezcla de vitaminas Tween - 80 y 10.0 ml de suero bovino inactivado a 56°C.

5.1.4.- Pruebas de esterilidad.

Las pruebas de esterilidad se llevaron a cabo para determinar la existencia de una posible contaminación por bacterias, fueron las siguientes:

La primera fue incubar el medio - - TYI-S-33 durante 24 horas a 37°C., habiendo transcurrido las 24 horas se procedió a inocular el medio TYI-S-33 a medios de cultivos enriquecidos para anaerobios y aerobios, con la ayuda de una asa bacteriológica. Estos medios se incubaron a 24 y 48 horas a 37°C.

En ambas pruebas no se presentó el desarrollo de microorganismos.

5.1.5.- Inoculación de los trofozoitos al medio-
de cultivo TYI-S-33.

La cepa de Entamoeba histolytica - que se cultivó en el laboratorio, fue la cepa HMI-IMSS (proporcionada por Ramírez, Laboratorio de Inmunoquímica, Hospital - Infantil de México, S.S.A.).

Se usaron tubos de ensaye de 15 x - 125 mm. con tapón de rosca; por lo general cada tubo contenía aproximadamente - 1×10^6 trofozoitos/10 ml.

El tubo que se utilizó para inocu- lar cada matraz se colocó en baño de hie- lo por cinco minutos para desprender - las células de las paredes del tubo, que contenía 10.0 ml del medio de cultivo - con 3×10^5 trofozoitos/3 ml. Esta cantidad fue usada para inocular los matra- ces de 125.0 ml, que contenían 87.0 ml - de caldo TYI-S-33. Después se incubaron a 37°C. durante 72 horas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.1.6.- Recolección, lavado y determinación de la viabilidad de los trofozoitos mediante la técnica de exclusión con azul tripano.

Después de haber obtenido un buen desarrollo de las células a las 72 horas, los matraces se colocaron en baño de hielo para ayudar al desprendimiento de las células y se colocaron en tubos para centrifuga de 50.0 ml con tapón de rosca y se centrifugaron a $500 \times G$ durante 15 minutos con solución salina reguladora de fosfatos a un pH de 7.0.- El procedimiento se repitió ocho veces con un volumen total de 80.0 ml. Al terminar con el lavado de las células se comprobó la viabilidad de los trofozoitos con azul tripano al 0.2% en donde se observó 97% de viabilidad.

5.2.- Cálculo del número total de trofozoitos.

Los trofozoitos se ajustaron a una concentración de 2×10^8 células/ml. El número total de células se contó mediante una cámara de Neubauer y una pipeta para glóbulos blancos, con los siguientes cálculos:

$$\frac{a.b.c.}{d} \cdot e =$$

- a).- Suma de los cuatro cuadros grandes de la cámara de Neubauer.
- b).- Dilución de la pipeta 1:20
- c).- Factor para determinar el valor por mm^3 . - (10).
- d).- Número de cuadro (4)
- e).- Factor para determinar el valor por ml. - (1000).

EJEMPLO:

$$\frac{a.20.10}{4} \cdot 1000 = 50,000 \text{ células/ml}$$

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

5.3.- Obtención y separación de las proteínas en las cinco cepas de amibas estudiadas mediante centrifugación diferencial.

100×10^6 trofozoitos de Entamoeba histolytica de las cepas AHM-I, HMI-IMSS Zimodemo II y HM-531 Zimodemo hartmanni y Entamoeba chattoni - cepas PM-4 y PM-5, cultivadas axénicamente.

Fueron lavadas de 8 a 10 veces con solución salina reguladora de fosfatos 0.15 M pH 7.0.

5.3.1.- Empleo de los inhibidores enzimáticos.

Se prepararon soluciones de FMSP, - EDTA y N-Etil Maleimide anhidro a una concentración de 200 mM. De estas soluciones se adicionó 0.3 ml de cada uno de los inhibidores.

5.3.2.- Homogenización.

Los trofozoitos fueron resuspendidos a un volumen de 3.0 ml de PBS y los cuales fueron homogenizados durante 10 minutos bajo hielo, en un Homogenizador Potter-Elvehjem siguiendo el protocolo que a continuación se relata:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.4.- Purificación parcial de las proteínas utilizando una columna de Ultrogel ACA-44.

5.4.1.- Concentración de las proteínas.

PROCEDIMIENTO:

Las proteínas del sobrenadante (3)- fueron unidas y colocadas en Minicon - - B-15 "Amicon Corporation Lexington, - - Mass"., hasta tener una concentración - aproximada de 10 mg/ml. de proteína de - acuerdo a la lectura obtenida a 280 nm.- en un espectrofotómetro Beckmann modelo- 26.

5.4.2.- Cromatografía en columna sobre Ultrogel-ACA-44.

La dextrana fue lavada con agua des- tilada y desgaseada al vacío con solu- - ción de PBS. Con ella se montó una co- - luma LKB 2137-026 de 43 cms. de largo y 2.5 cms. de diámetro y se determinó el - volumen de vacío con azul dextrana 2,000 al 0.5% mediante un colector LKB REDIRAC 2112 "BROMMA". Se obtuvieron las protef- nas levigadas en un volumen de 3.0 ml ca da cinco minutos. Estas fracciones pro-

teicas fueron graficadas en un registrador LKB 2210-2 "BROMMA".

5.4.3.- Diálisis de las proteínas obtenidas.

Las fracciones proteicas contenidas en los picos de los levigados fueron dializadas durante 24 horas contra agua destilada.

5.4.4.- Liofilización de las proteínas obtenidas.

Una vez terminada la diálisis se procedió a congelar las fracciones proteicas y se colocaron en un Liofilizador FREEZE, DRYER 3, "LABCONCO".

5.5.- Investigación de la actividad biológica de las -
fracciones proteicas en las cinco cepas de ami-
bas estudiadas frente a sueros de pacientes con-
absceso hepático amibiano y/o colitis amibiana -
mediante la técnica de hemaglutinación pasiva.

5.5.1.- Solución de alsevers.

Se pesaron 2.05 g. de glucosa, - -
0.8 g. de citrato de sodio, 0.085 g. de-
ácido cítrico y 0.42 g. de cloruro de so-
dio, los cuales fueron disueltos y se -
llevaron a un volumen de 100,0 ml con -
agua destilada. Se esterilizó durante -
10 minutos a 10 lb. de presión

5.5.2.- Suspensión de glóbulos rojos de carnero.

Se tomó un volumen igual de glóbu-
los rojos de carnero a la solución de -
alsevers ya preparadas y se guardó en re-
frigeración a 4°C. durante diez días pa-
ra su maduración.

5.5.3.- Preparación del antígeno.

Se pesaron 2 mg. de todas y cada una de las fracciones proteicas obtenidas de las cinco cepas de amibas y se diluyeron en 1 ml. de PBS a un pH de 7.0 - con éstas se farraron los glóbulos rojos de camero madurados.

5.5.4.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 7.2.

5.5.4.1.- Solución de fosfato de potasio monobásico a 0.15 M. Se pesaron 10.20 g. de fosfato de potasio monobásico y se disolvieron en 500.0 ml de agua destilada.

5.5.4.2.- Solución de fosfato de sodio dibásico a 0.15 M. Se pesaron 20.15 g. de fosfato de sodio dibásico y se disolvieron en 500.0 ml de agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

Se mezclaron 24.0 ml de la solución de fosfato de potasio monobásico con 76.0 ml de la solución de fosfato de sodio dibásico y 100.0 ml de solución salina isotónica al 0.085%.

5.5.5.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4.

5.5.5.1.- La solución fue preparada de acuerdo al inciso 5.5.4.1.

5.5.5.2.- La solución fue preparada de acuerdo al inciso 5.5.4.2.

PROCEDIMIENTO:

Se mezclaron 67.8 ml de la solución de fosfatos de potasio monobásico con 32.2 ml de la solución de fosfato de sodio dibásico y 100.0 ml de solución salina isotónica al 0.089%.

5.5.6.- Solución de ácido tánico al 1%.-

Se pesó 1 g. de ácido tánico y se le adicionó 99.0 ml de solución salina isotónica al 0.089%, se guardó en refrigeración a 4°C. De esta solución se hizo una dilución 1:200, para tener la solución final de trabajo de ácido tánico 1:20,000.

5.5.7.- Suero de conejo normal inactivado a 56°C

Por punción cardíaca se extrajo la sangre de un conejo de la raza Nueva Zelanda con un peso aproximado de 3.0 Kg.

y se centrifugó a 500 x G durante 15 minutos y se separó el suero almacenándolo en un frasco para ser inactivado a 56°C. durante 30 minutos.

5.5.8.- Adsorción de los glóbulos rojos de carne ro con las fracciones proteicas.

Se tomaron 3.0 ml de los glóbulos rojos de carnero almacenados en solución de alsevers estéril, se lavaron tres veces con solución salina y se preparó una suspensión al 2% de glóbulos rojos de carnero. Después se le añadió 3.0 ml de suero normal de conejo inactivado y se les dejó reposar durante toda una noche en refrigeración a 4°C. Al día siguiente se centrifugó a 500 x G durante 15 minutos y se separó el suero de conejo adsorbido y se diluyó 1:100.

Se tomó el paquete de glóbulos rojos de camero y se le añadió 3.0 ml de ácido tánico diluido 1:20,000 el cual se incubó a 37°C. en la estufa durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 500 x G durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante, se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 7.2. y se centrifugó a 500 x G en donde se descartó el sobrenadante y se volvió a lavar con solución amortiguadora -

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de fosfatos salinos pH 6.4.

Los glóbulos rojos de camero tanzados se les adicionó 4.0 ml de solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4 y 1.0 ml del antígeno y/o fracción proteica estudiada, se centrifugó a 500 x G durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se le añadió 2.0 ml de suero normal de conejo diluido 1:100. El sedimento se volvió a centrifugar y se le agregó nuevamente 5.0 ml de suero normal de conejo diluido 1:100.

Se preparó un control positivo con 1.0 ml. de glóbulos rojos de camero tanzados al 2% con 4.0 ml de solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4 y 1.0 ml de antígeno que consistió en un homogenizado de Entamoeba histolytica - cepa HMI-IMSS Zimodemo II. El control negativo fue preparado con 1.0 ml de glóbulos rojos de camero tanzados al 2% más 4.0 ml de solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4 en ausencia de antígeno amibiano.

PROCEDIMIENTO:

Utilizando placas de limbro se llevaron a cabo diluciones de los sueros de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

pacientes con absceso hepático amibiano-
y/o colitis amibiana en proporción loga-
rítmica. Es decir 1:2, 1:4, 1:8, 1:16,-
1:32, etc. teniendo como diluyente el -
suero de conejo normal adsorbido diluido
1:100.

Posteriormente se les añadió 20 - -
lambdas de glóbulos rojos de camero ta-
nizados al 2% forrados con las fraccio-
nes proteicas, se les dejó reposar durante
te 24 horas.

5.6.- Investigación de la actividad biológica de las - fracciones proteicas en las cinco cepas de ami- bas estudiadas frente a sueros de los hámsters - inmunizados mediante la técnica de hemaglutina- ción pasiva.

5.6.1.- Solución de alsevers.

La solución fue preparada de acuer- do al inciso 5.5.1.

5.6.2.- Suspensión de glóbulos rojos de carnero.

La suspensión fue preparada de - - acuerdo al inciso 5.5.2.

5.6.3.- Preparación del antígeno.

El antígeno se preparó de acuerdo - al inciso 5.5.3.

5.6.4.- Solución amortiguadora de fosfatos sali- nos pH 7.2.

La solución se preparó de acuerdo - al inciso 5.5.4.1 y 5.5.4.2.

5.6.5.- Solución amortiguadora de fosfatos sali- nos pH 6.4.

La solución fue preparada de acuer- do al inciso 5.5.5.1 y 5.5.5.2.

5.6.6.- Solución de ácido tánico al 1%.

La solución fue preparada de acuerdo al inciso 5.5.6.

5.6.7.- Suero de conejo normal inactivado a 56°C

El suero utilizado se preparó de acuerdo al inciso 5.5.6.

5.6.8.- Adsorción de los glóbulos rojos de carnero con las fracciones proteicas.

Los glóbulos rojos de carnero fueron adsorbidos de acuerdo al inciso 5.5.8.

PROCEDIMIENTO:

El procedimiento se realizó en la misma forma a partir del inciso 5.5.1, - la diferencia fue el utilizar los sueros de los hámsters inmunizados con las fracciones proteicas de las diferentes cepas de amibas estudiadas.

5.7.- Investigación de la actividad protectora de las fracciones proteicas obtenidas en las diferentes cepas de amibas en el hámster dorado de Siria.

5.7.1.- Inmunización.

Mediante números aleatorios se formaron lotes de seis animales machos con un peso que fluctuó entre 50 y 60 g. a los que se les inoculó intradérmicamente 0.1 ml. de una suspensión hecha de 2 mg. de antígeno de cada fracción proteica obtenida y 1.0 ml de adyuvante completo de Freund, durante tres semanas cada tercer día y se les dejó descansar una semana.

5.7.2.- Desafío intrahepático.

Después de la cuarta semana los animales inmunizados fueron inoculados intrahepáticamente con 50,000 amibas contenidas en un volumen de 0.1 ml y se les dejó en reposo una semana.

5.7.3.- Sacrificio de los animales inoculados.

Los animales fueron anestesiados con éter etílico anhidro y rasurados en la cavidad abdominal en donde se les colocó un antiséptico cutáneo y se llevó a cabo una incisión hasta cavidad torácica de donde se extrajo por punción cardíaca 2 ml de sangre; y se extirpó el hígado - analizando la presencia de lesiones hepáticas macroscópicas.

5.8.- Estudio histopatológico de las lesiones observadas en el hígado de los animales inoculados.

Los hígados extirpados de los animales inoculados fueron colocados en formol al 10% para llevarse a cabo el estudio histopatológico por el Dr. Pedro Francisco Valencia Mayoral, Jefe del Departamento de Patología de esta Institución.

5.8.1.- Preparación de los tejidos.

Se hicieron cortes seleccionados del hígado estudiado y de inmediato fueron fijados en una solución de formol al 10% por 24 horas. Posteriormente fueron encapsulados y se lavaron con agua corriente durante 24 horas.

5.8.2.- Procesado de los tejidos.

Se sometieron a deshidratación en el procesador de tejidos "American Optical" No. 8000.

5.8.2.1.- Deshidratación, aclaramiento e inclusión.

Se deshidrataron con tres alcoholes al 90%, 3 alcoholes absolutos, 3 agentes aclarantes como el xilol-xileno, 3 parafinas y una parafina más pa-

ra hacer la inclusión del tejido y formar el cubo para su corte. La inclusión se llevó a cabo en parafina y el corte realizado se hizo en un microtomo Modelo 820 "American optical", a un espesor de 3 micras. Posteriormente se tiene el corte en un baño de flotación a una temperatura de 46°C. marca "Voekel", aquí se tomó el corte en el portaobjetos y se llevó a una estufa modelo HDT-27 a una temperatura de 50°C.

5.8.3.- Tinción de hematoxilina-eosina.

Después de llevar a cabo el proceso de la desparafinización e hidratación se tiñó con la hematoxilina-eosina. Posteriormente se deshidrató con 3 alcoholes al 90%, 3 alcoholes absolutos, 1 alcohol xilol en partes iguales (1:1) y 3 agentes aclarantes (xilol) cubiertos con resina sintética y añadiendo un cubreobjetos de 24 x 40 mm para su estudio al microscopio de luz.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.8.4.- Observaciones microscópicas.

El estudio de microscopía de luz se llevó a cabo tomando en cuenta los siguientes parámetros.

a).- Presencia de absceso, b).- Ami
bas, c).- Necrosis basófila, d).- Activi
dad en bordes, e).- Inflamación, f).- Lin
focitos, g).- Polimorfonucleares, - -
h).- Macrófagos, i).- Células plasmáti--
cas, j).- Fibroblastos, k).- Microorga--
nismos, l).- Esférulas, ll).- Granulomas
y m).- Otros.

Así como la apreciación cuantitati-
va:

(+) Presencia.

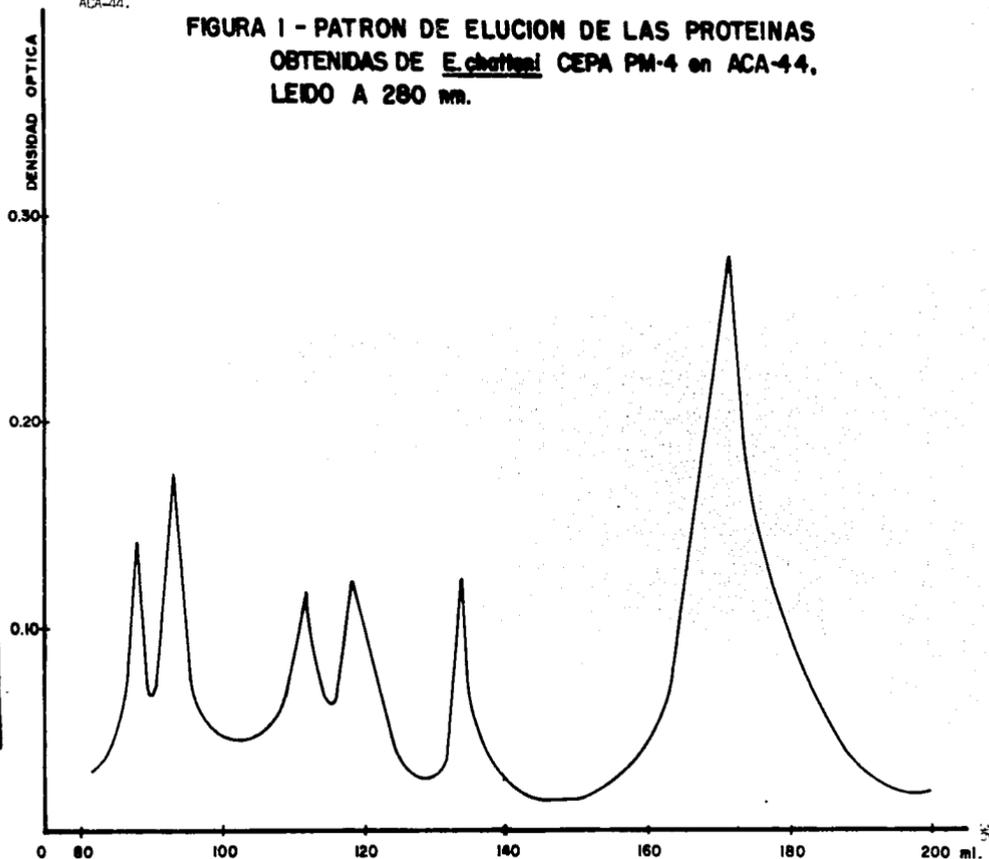
(++) Cantidad moderada.

(+++)
Abundantes o extensa.

6.0.- RESULTADOS.

La purificación parcial de las proteínas aisladas de la cepa Entamoeba chattoni PM-4 se presentan en la Figura 1, las cuales representan los picos de elución obtenidos de las proteínas levigadas de la columna en Ultrogel - ACA-44.

**FIGURA 1 - PATRON DE ELUCION DE LAS PROTEINAS
OBTENIDAS DE E. chattoni CEPA PM-4 en ACA-44,
LEIDO A 280 m μ .**

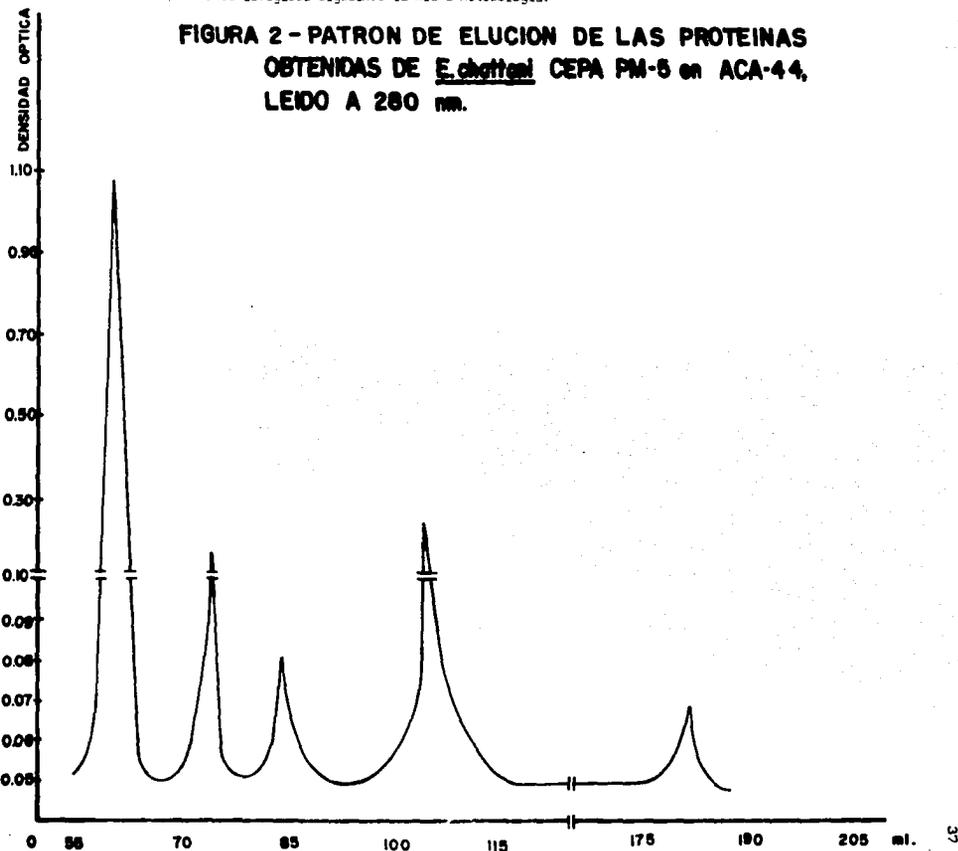


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

32

Así como los resultados obtenidos con la cepa Entamoeba chattoni PM-5 se muestran en la Figura 2 donde se observan las proteínas levigadas siguiendo la misma metodología.

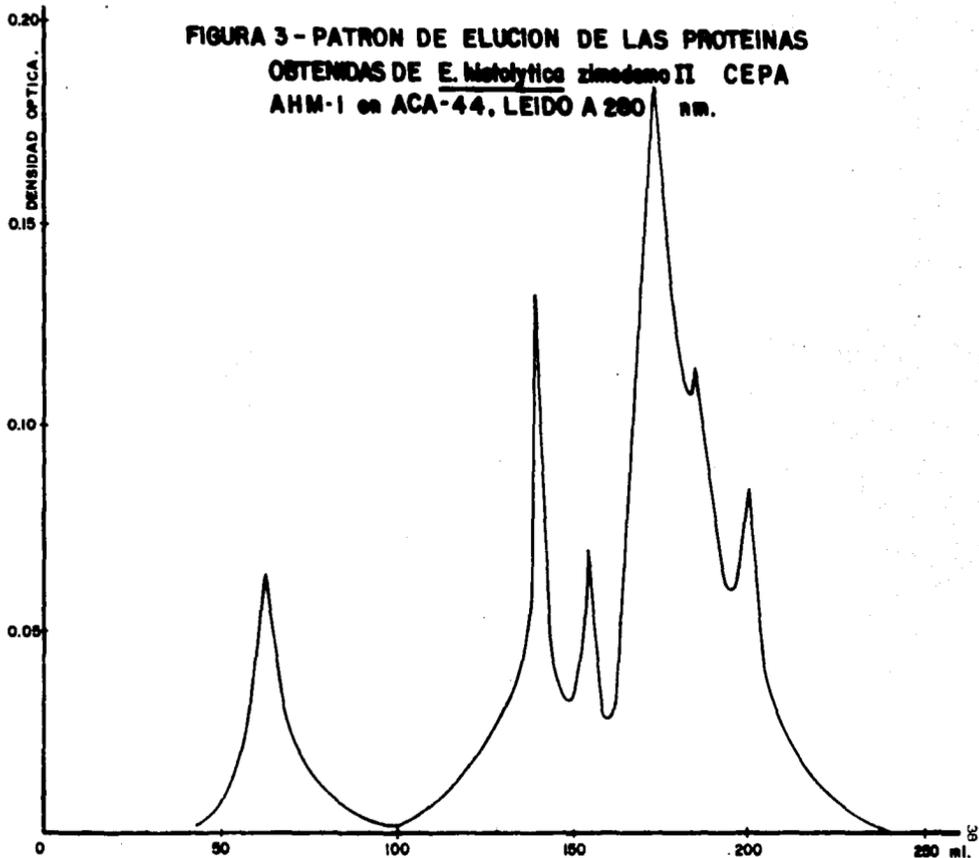
**FIGURA 2 - PATRON DE ELUCION DE LAS PROTEINAS
OBTENIDAS DE E. chattoni CEPA PM-5 en ACA-44,
LEIDO A 280 nm.**



TESIS CON
MILLA DE ORIGEN

En relación a las proteínas levigadas de la cepa AHM-1 Entamoeba histolytica Zimodemo II los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.

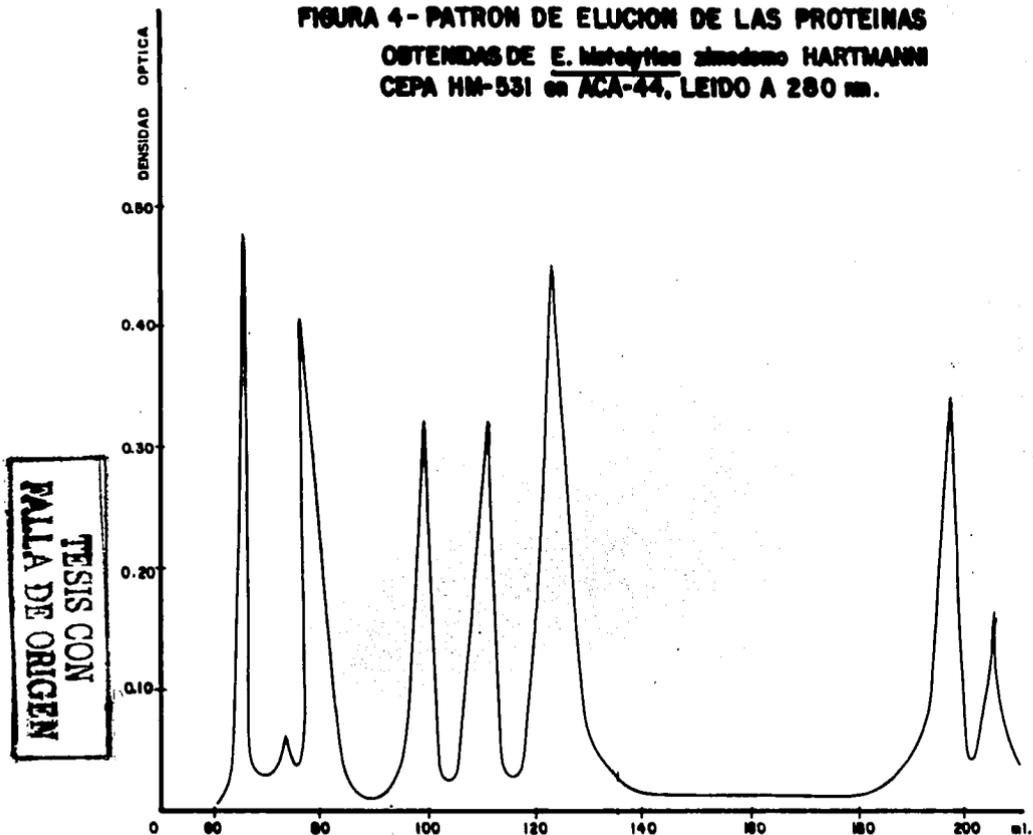
**FIGURA 3 - PATRON DE ELUCION DE LAS PROTEINAS
OBTENIDAS DE E. histolytica zimodemo II CEPA
AHM-1 en ACA-44, LEIDO A 280 nm.**



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

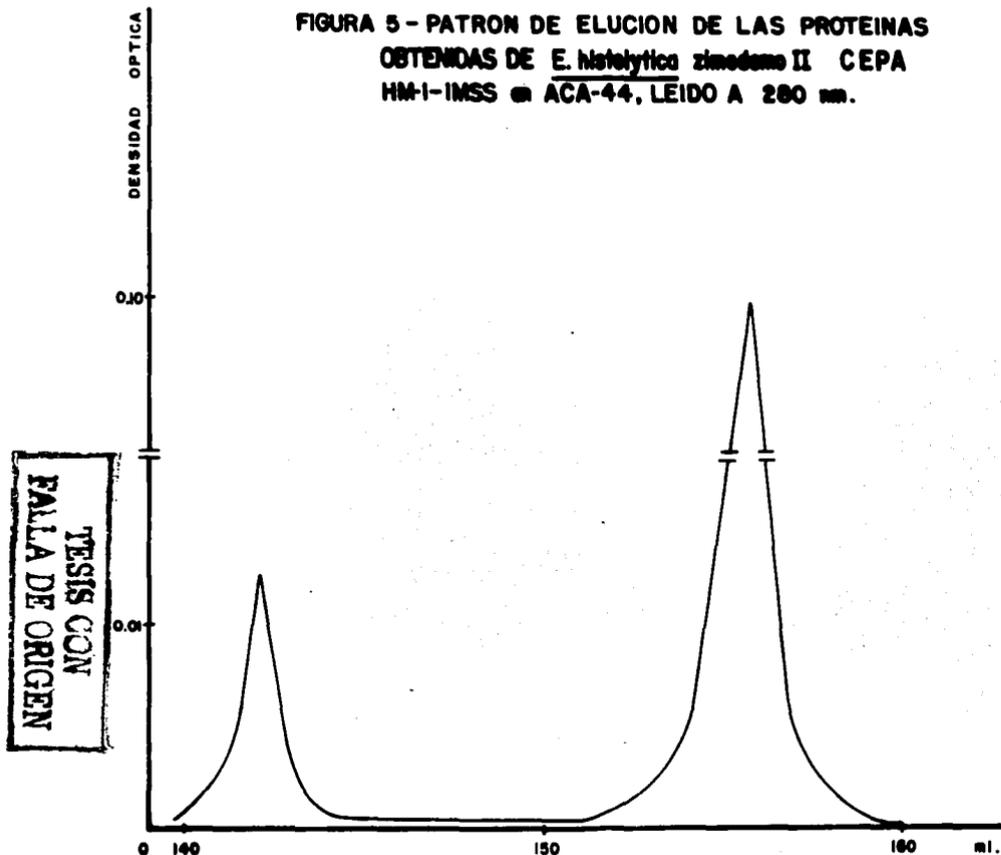
Y en cuanto a la separación proteica de la cepa HM-531 *Zimodemo hartmanni* los resultados se representan en la Figura 4.

**FIGURA 4- PATRON DE ELUCION DE LAS PROTEINAS
OBTENDAS DE *E. histolytica* zimodemo HARTMANNI
CEPA HM-531 en ACA-44, LEIDO A 280 nm.**



Así mismo el estudio de la cepa HM-I-IMSS Zimodemo II se ve representada en la Figura 5 en sus fracciones levigadas mediante la cromatografía en columna de Ultrogel ACA-44.

**FIGURA 5 - PATRON DE ELUCION DE LAS PROTEINAS
OBTENIDAS DE *E. histolytica* zimodemo II CEPA
HM-I-IMSS en ACA-44, LEIDO A 280 nm.**



La investigación de la actividad biológica de todas las fracciones proteicas obtenidas de cada una de las cepas estudiadas, - se llevó a cabo utilizándolas como antígenos frente a sueros de - pacientes con absceso hepático amibiano y/o colitis amibiana, con el objeto de investigar si existían determinantes antigénicos com- partidos con una amiba invasora responsable de un absceso hepáti- co de acuerdo al título de anticuerpos obtenidos. Simultáneamen- te se determinó el título de anticuerpos presentes utilizando aho- ra como antígeno un homogenizado total de Entamoeba histolytica - cepa HMI-IMSS Zimodemo II frente a los sueros de pacientes con - absceso hepático amibiano y/o colitis amibiana, los resultados ob- tenidos se presentan en la tabla I cuando se utilizaron las frac- ciones proteicas de la cepa Entamoeba chattoni PM-4.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CEPA PM-4

TABLA-I

**ANTICUERPOS DEL SUERO DE PACIENTES CON ABSCESO
HEPÁTICO AMIBIANO O COLITIS AMIBIANA**

F ₁	vs. AgHMI	F ₂	vs. AgHMI	F ₃	vs. AgHMI	F ₄	vs. AgHMI	F ₅	vs. AgHMI	F ₆	vs. AgHMI
1:40	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:40	1:80	1:160	1:80	1:20480	1:80
1:80	1:80	1:80	1:40	1:160	1:40	1:80	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40
NEGATIVO	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80
1:20	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:1280	1:80
1:20	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	NEGATIVO	1:80	1:320	1:80
1:160	1:640	1:40	1:640	1:40	1:640	1:80	1:640	1:160	1:640	1:1280	1:640
1:80	1:80	1:80	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:1280	1:80
NEGATIVO	1:40	1:80	1:40	1:40	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
NEGATIVO	1:40	1:80	1:140	1:40	1:40	NEGATIVO	1:40	1:40	1:40	NEGATIVO	1:40
NEGATIVO	1:40	1:320	1:40	1:40	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	1:40	1:40
NEGATIVO	1:40	1:160	1:40	1:40	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	1:40	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	1:40	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	1:40	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
1:20	1:160	1:40	1:160	1:40	1:160	1:40	1:160	1:40	1:160	1:80	1:160
1:20	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:80	1:80
NEGATIVO	1:80	1:320	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	1:80	1:80
NEGATIVO	1:40										

**TESIS CON
FALTA DE ORIGEN**

Así mismo en la tabla II se representan los títulos de anticuerpos obtenidos con las fracciones proteicas de la cepa Entamoeba chattoni PM-5 y el homogenizado total de Entamoeba histolytica cepa - HMI-IMSS Zimodemo II frente a los sueros de pacientes con absceso hepático amibiano y/o colitis amibiana.

CEPA PM-5

TABLA-II

ANTICUERPOS DEL SUERO DE PACIENTES CON ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO O COLITIS AMIBIANA									
F ₁	vs. AgHMI	F ₂	vs. AgHMI	F ₃	vs. AgHMI	F ₄	vs. AgHMI	F ₅	vs. AgHMI
NEGATIVO	1:80	1:180	1:80	1:40	1:40	1:20	1:80	1:20	1:80
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	1:40	1:40	1:20	1:40	1:20	1:40
1:20	1:80	1:80	1:80	1:40	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80
1:40	1:80	1:40	1:80	1:80	1:80	1:40	1:80	1:80	1:80
1:40	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80
NEGATIVO	1:640	1:20	1:640	1:20	1:640	1:20	1:640	1:40	1:640
NEGATIVO	1:80	1:40	1:80	1:20	1:80	1:20	1:80	1:20	1:80
1:20	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
1:40	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
1:20	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
1:40	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	1:20	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	1:80	1:40
1:40	1:160	1:20	1:160	NEGATIVO	1:160	NEGATIVO	1:160	NEGATIVO	1:160
1:40	1:80	1:20	1:80	1:20	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:640
NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

En relación a las fracciones proteicas contenidas de la cepa AHM-I Zimodero II los resultados de el título de anticuerpos obtenidos frente al suero de pacientes con absceso hepático amibiano y/o colitis amibiana y el título de anticuerpos obtenidos utilizando un homocizato total de *Entamoeba histolytica* cepa HWI-IVSS Zimodero II corresponde a la tabla - III.

CEPA AHM-I

TABLA-III

ANTICUERPOS DEL SUERO DE PACIENTES CON ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO O COLITIS AMIBIANA											
F ₁	v.s. AgHMI	F ₂	v.s. AgHMI	F ₃	v.s. AgHMI	F ₄	v.s. AgHMI	F ₅	v.s. AgHMI	F ₆	v.s. AgHMI
1:40	1:80	1:40	1:80	1:80	1:40	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80
1:40	1:40	1:80	1:40	1:40	1:80	NEGATIVO	1:40	1:40	1:40	NEGATIVO	1:40
1:40	1:80	1:40	1:80	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	1:20	1:80
1:40	1:80	1:40	1:80	NEGATIVO	1:40	1:40	1:80	NEGATIVO	1:80	1:20	1:80
1:40	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80
1:320	1:640	1:640	1:640	1:160	1:640	1:160	1:640	1:80	1:640	1:160	1:640
1:40	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:40	1:80	1:20	1:80
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1:40	1:40	1:40	NEGATIVO	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1:40	1:20	1:40	1:20	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
1:40	1:40	1:40	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
1:40	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
1:40	1:160	1:40	1:160	1:40	1:40	1:80	1:160	1:40	1:160	1:80	1:160
NEGATIVO	1:80	1:40	1:80	1:40	1:40	NEGATIVO	1:80	1:20	1:80	1:20	1:80
NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40

**TESIS CON
FALTA DE ORIGEN**

La tabla IV nos muestra el título de anticuerpos obtenidos con las fracciones proteicas de la cepa HM-531 Zimodero - hartmanni frente a los sueros de pacientes con absceso hepático amibiano y/o colitis amibiana así como el título de anticuerpos obtenidos con un nonpenizado total de la cepa HM-1MSS Zimodero II.

CEPA HM531

TABLA-IV

ANTICUERPOS DEL SUERO DE PACIENTES CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO O COLITIS AMIBIANA														
F ₁	v.s. AgHMI	F ₂	v.s. AgHMI	F ₃	v.s. AgHMI	F ₄	v.s. AgHMI	F ₅	v.s. AgHMI	F ₆	v.s. AgHMI	F ₇	v.s. AgHMI	
1:80	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:80	NEGATIVO	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80
1:80	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	NEGATIVO	1:40	1:40	1:40	1:80	1:40
1:320	1:80	1:40	1:80	1:80	1:80	1:40	1:80	1:80	NEGATIVO	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80
1:40	1:80	1:160	1:80	1:320	1:80	1:160	1:80	1:80	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:80
1:160	1:80	1:40	1:80	1:320	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	NEGATIVO	1:80	1:80
1:80	1:640	1:40	1:640	1:2560	1:640	1:80	1:640	1:80	1:640	1:160	1:640	1:40	1:640	1:640
NEGATIVO	1:80	1:40	1:80	1:2560	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	1:40	1:40	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40	1:40
1:320	1:160	1:40	1:160	NEGATIVO	1:160	NEGATIVO	1:160	1:40	1:160	1:80	1:160	1:80	1:160	1:160
1:80	1:80	1:40	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80	1:40	1:80	NEGATIVO	1:80	1:80
1:80	1:80	NEGATIVO	1:80	1:80										
1:320	1:40	NEGATIVO	1:40	1:40										

**FESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Finalmente con las fracciones obtenidas de la cepa HMI-IMSS Zimodemo II se determinó el título de anticuerpos obtenidos con los sueros de pacientes con absceso hepático amibiano y/o colitis amibiana así como el título de anticuerpos obtenidos frente a un homogenizado total de Entamoeba histolytica cepa HMI-IMSS Zimodemo II - lo cual se representa en la tabla V.

CEPA HMI-I

TABLA-V

**ANTICUERPOS DEL SUERO DE PACIENTES CON ABSCESO
HEPÁTICO AMIBIANO O COLITIS AMIBIANA**

F_1	vs. Ag HMI	F_2	vs. Ag HMI
1:40	1:80	1:40	1:80
1:40	1:40	NEGATIVO	1:40
NEGATIVO	1:80	1:40	1:80
1:40	1:80	1:40	1:80
1:40	1:80	1:40	1:80
1:40	1:640	1:80	1:640
1:40	1:80	1:40	1:80
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
1:40	1:40	NEGATIVO	1:40
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40
1:80	1:160	1:20	1:160
NEGATIVO	1:80	NEGATIVO	1:80
1:40	1:80	NEGATIVO	1:80
NEGATIVO	1:40	NEGATIVO	1:40

**TEST CON
VALIA DE ORIGEN**

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos de los títulos de anticuerpos para cada fracción proteica de cada una de las cepas se presenta en la tabla VI donde se analizó el número de sueros que dió un título positivo de anticuerpos utilizando las fracciones proteicas de las diferentes cepas de amibas estudiadas con respecto al título obtenido con un antígeno total de la cepa HM-IMSS Zimodemo II.

TABLA-VI

INVESTIGACION: DEL NUMERO DE FRACCIONES POSITIVAS Y NEGATIVAS CON RESPECTO AL TITULO DE ANTICUERPOS DETERMINADOS POR HEMAGLUTINACION.

CEPA	FRACCIONES														x ²	°L	p
	F ₁		F ₂		F ₃		F ₄		F ₅		F ₆		F ₇				
	positivo	negativo															
PM-4	8/17	9/17	14/17	3/17	15/17	2/17	9/17	8/17	9/17	8/17	12/17	5/17			11.12	5	0.025
PM-6	8/17	9/17	7/10	10/17	10/17	7/17	5/17	12/17	6/17	11/17					1.283	4	0.20
AHM-1	10/17	7/17	9/17	8/17	7/17	10/17	4/17	13/17	6/17	11/17	6/17	11/17			6.865	5	0.20
HM-531	10/17	7/17	9/17	8/17	7/17	10/17	7/17	10/17	5/17	12/17	10/17	7/17	8/17	9/17	4.721	6	0.20
HM-1	9/17	8/17	7/17	10/17											17.236	1	<0.001

FALTA DE ORIGEN

La tabla VII presenta los cálculos del coeficiente de correlación lineal entre los títulos obtenidos cuantitativamente de las diferentes fracciones proteicas con respecto al antígeno total en los sueros de pacientes con absceso hepático amibiano y/o colitis amibiana.

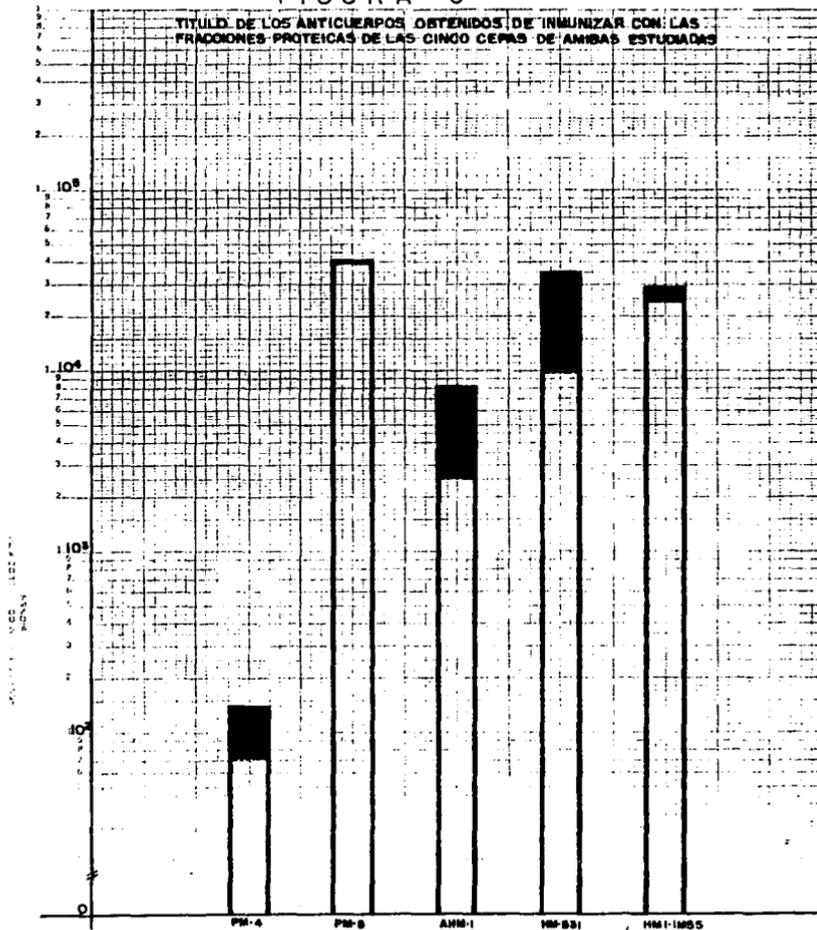
TABLA-VII

CORRELACION ENTRE LOS DETERMINANTES ANTIGENICOS DE LAS FRACCIONES AISLADAS EN LAS CEPAS ESTUDIADAS Y LOS PRESENTES EN LA CEPA HM UTILIZANDO SUEROS DE PACIENTES CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO O COLITIS AMIBIANA.								
CEPA		F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F _T
PM-4	r	0.79	0.24	0.13	0.58	0.70	0.029	
	t	3.15	0.856	0.472	1.883	2.593	0.0917	
	*L	6	12	13	7	7	10	
	p	0.02	N.S.	N.S.	0.10	0.025	N.S.	
PM-5	r	0.34	0.34	0.35	0.25	0.17		
	t	0.885	0.808	0.398	0.4093	0.3450		
	*L	6	5	5	3	4		
	p	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.		
AHM-1	r	0.98	0.97	0.91	0.94	0.90	0.96	
	t	13.929	10.566	4.907	3.898	4.129	6.857	
	*L	8	7	5	2	4	4	
	p	< 0.001	< 0.001	0.005	0.05	0.01	< 0.001	
HM-631	r	0.17	0.17	0.65	0.18	0.57	0.94	0.23
	t	0.544	0.3460	1.923	0.4091	1.2015	7.792	0.5789
	*L	8	7	5	5	3	8	6
	p	N.S.	N.S.	0.10	N.S.	N.S.	< 0.001	N.S.
HM-1	r	0.035	0.84					
	t	0.0926	3.461					
	*L	7	5					
	p	N.S.	0.005					

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La investigación de la capacidad inmunogénica de las fracciones proteicas en cada cepa fue determinada por el título de anticuerpos presentes en el suero de los hámsters inmunizados frente a cada una de las fracciones proteicas utilizadas como antígenos, los resultados se muestran en la Figura 6, donde se presenta la media obtenida en cada una de ellas.

FIGURA - 6



TESIS C^ond
FALLA DE ANTIGEN

Continuando con el análisis global entre las lesiones hepáticas macroscópicas y microscópicas así como el título de anticuerpos obtenidos en todos y cada uno de los animales estudiados e inoculados con las fracciones proteicas obtenidas se representan en la tabla VIII para la cepa Entamoeba chattoni PM-4.

CEPA PM-4

TABLA-VIII

FRACCIONES DE LA CEPA PM-4	Nº DE ANIMALES INOCULADOS DURANTE 3 SEMANAS INTRADERMICAMENTE.	DESAFIO INTRA-HEPÁTICO CON SÓLOLO AMEBAS x mL DE LA CEPA PM-4	ANTICUERPOS V.S. PM-4	DESPUES DE 8 DIAS SE INVESTIGO LOS RESULTADOS DE PRESENCIA DE ABSCESOS	
				OBSERVACION MACROSCOPICA	OBSERVACION MICROSCOPICA
FRACCION I	1	0.1 ml.	1.40	ABSCESO SUPERFICIAL EN LOBULO MEDIO 0.8 cm.	ABSCESO PERIHEPATICO
	2		NEGATIVO	S. A. M. I.	ABSCESO PERIHEPATICO SUBDIAPHRAMATICO.
	3		1.20	TRES PUNTOS EN LOBULO MEDIO	ABSCESO PERIHEPATICO
	4		1.180	ABSCESO SUBDIAPHRAMATICO DE 0.2 cm Y LOBULO MEDIO	ABSCESO EXTRAPERITONICO Y MORTO SUBDIAPHRAMATICO
	5		1.40	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS AGUDA Y EXTENSA
FRACCION II	6	0.1 ml.	1.80	ABSCESO EN LOBULO MEDIO 0.2 cm.	HEPATITIS GRANULOMATOSA Y PERIHEPATITIS CRONICA Y AGUDA
	7		NEGATIVO	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA FOCAL
	8		1.40	AUTOLISIS	PERIHEPATITIS CRONICA FOCAL
	9		1.180	HIGADO PALIDO	S. A. M. I.
	10		1.40	HIGADO PALIDO	HEPATITIS GRANULOMATOSA
FRACCION III	11	0.1 ml.	NEGATIVO	ADHERENCIA PERIHEPATICA	S. A. M. I.
	12		1.40	AUTOLISIS	AUTOLISIS
	13		1.40	S. A. M. I.	NECROABSCESO HEPATICO NO AMBIARO
	14		NEGATIVO	TRAYECTO HEMORRAGICO x PUNCIÓN	HEPATITIS GRANULOMATOSA LEVE
	15		1.40	AUTOLISIS	AUTOLISIS
FRACCION IV	16	0.1 ml.	1.40	S. A. M. I.	S. A. M. I.
	17		1.40	S. A. M. I.	ABSCESO HEPATICO AMBIARO
	18		1.80	HIGADO PALIDO Y COLESTASIS	PERIHEPATITIS FOCAL
	19		1.80	AUTOLISIS	PERIHEPATITIS AGUDA Y EXTENSA
	20		1.80	HIGADO PALIDO	ABSCESO PERIHEPATICO Y PERIHEPATITIS CRONICA Y AGUDA
FRACCION V	21	0.1 ml.	NEGATIVO	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS EXTENSA
	22		NEGATIVO	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS CRONICA FOCAL
	23		NEGATIVO	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS CRONICA FOCAL
	24		1.40	MODULO BLANQUECINO EN EL HILIO	PERIHEPATITIS CRONICA EXTENSA
	25		1.80	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS FOCAL
FRACCION VI	26	0.1 ml.	1.80	HIGADO PALIDO	HEPATITIS GRANULOMATOSA LEVE, PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA FOCAL
	27		1.40	HIGADO PALIDO	HEPATITIS GRANULOMATOSA LEVE, PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA FOCAL
	28		1.180	TRAYECTO HEMORRAGICO x PUNCIÓN	ABSCESO HEPATICO - NO SE RECONOCEN AMEBAS. NECROSIS HEMORRAGICA FOCAL Y PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA.
	29		1.80	S. A. M. I.	HEPATITIS GRANULOMATOSA
	30		1.180	S. A. M. I.	HEPATITIS GRANULOMATOSA
FRACCION VII	31	0.1 ml.	1.80	PERIHEPATITIS FOCAL	PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA FOCAL
	32		1.80	MODULOS DE NEROS DE 0.1 cm.	ABSCESO HEPATICO
	33		1.840	ABSCESOS EN LOBULO MEDIO 0.8 cm.	ABSCESO HEPATICO AMBIARO
	34		1.40	AUTOLISIS	AUTOLISIS
	35		1.40	HIGADO PALIDO	PERIHEPATITIS FOCAL
36	1.40	AUTOLISIS	S. A. M. I.		

**TESIS CON
 ETIQUETA DE ORIGEN**

Los resultados obtenidos de las alteraciones macroscópicas y microscópicas al trabajar con las fracciones proteicas - obtenidas de la cepa Enterocba chattoni PM-5 y desafiadas con una amiba invasora se muestran en la tabla IX.

CEPA PM-5

TABLA-IX

FRACCIONES DE LA CEPA PM-5	Nº DE ANIMALES INOCULADOS DURANTE 3 SEMANAS INTRAPERITONEALMENTE	DESARRO INTRA-HEPÁTICO CON 500,000 AMIBAS x ml. DE LA CEPA PM-5	ANTIQUEROS VS. PM-5	DESPUES DE 8 DIAS SE INVESTIGO LOS RESULTADOS DE PRESENCIA DE ABSCESO	
				OBSERVACION MACROSCOPICA	OBSERVACION MICROSCOPICA
FRACCION I	1	0.1 ml.	1:40880	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS EXTENSA
	2		1:40880	ABSCESO DE 0.5mm EN LOBULO MEDIO, BLANQUECINO CON CENTRO HEMORRAGICO	ABSCESO HEPATICO ENCAPSULADO
	3		1:40880	NODULO 0.1mm EN BORDE HEPATICO LOBULO DERECHO	ABSCESO HEPATICO ENCAPSULADO
	4		1:40880	NODULO DE 0.2mm, HEMORRAGICO, LOBULO MEDIO.	NECROABSCEOS NO AMBIANOS
	5		1:40880	AREA HEMORRAGICA EN LOBULO MEDIO	PERIHEPATITIS EXTENSA
	6		1:40880	NODULO HEMORRAGICO 0.3 mm.	PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA
FRACCION II	7	0.1 ml.	1:40880	NODULO 0.2 mm. EN LOBULO MEDIO	HEPATITIS GRANULOMATOSA
	8		1:40880	NODULO DE 0.4mm EN LOBULO MEDIO	ABSCESO HEPATICO AMBIANO ENCAPSULADO
	9		1:40880	NODULO BLANQUECINO 0.5 mm. EN LOBULO MEDIO	ABSCESO HEPATICO AMBIANO ENCAPSULADO
	10		1:40880	S. A. M. I.	HEPATITIS GRANULOMATOSA Y PERIHEPATITIS-AGUDA Y CRONICA
	11		1:40880	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS EXTENSA
	12		1:40880	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS EXTENSA Y HEPATITIS GRANULOMATOSA.
FRACCION III	13	0.1 ml.	1:40880	S. A. M. I.	NECROSIS COAGULATIVA MULTIFOCAL
	14		1:40880	S. A. M. I.	NECROSIS COAGULATIVA MULTIFOCAL
	15		1:40880	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA
	16		1:20480	S. A. M. I.	HEPATITIS GRANULOMATOSA
	17		1:20480	NODULO 0.4mm, CAFE BLANQUECINO EN LOBULO MEDIO.	ABSCESO HEPATICO AMBIANO ENCAPSULADO
	18		1:40880	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS EXTENSA
FRACCION IV	19	0.1 ml.	1:40880	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS FOCAL LEVE
	20		1:40880	S. A. M. I.	HEPATITIS GRANULOMATOSA
	21		1:2580	PUNTO DE MENOS DE 0.1mm EN LOBULO MEDIO SUPERFICIAL	ABSCESO PERIHEPATICO
	22		1:40880	S. A. M. I.	ABSCESO HEPATICO AMBIANO
	23		1:40880	ABSCESO DE 0.7 mm. EN LOBULO MEDIO	ABSCESO HEPATICO ENCAPSULADO
	24			AUTOLISIS	AUTOLISIS
FRACCION V	25	0.1 ml.	1:40880	AUTOLISIS	AUTOLISIS
	26		1:40880	ABSCESOS EN LOBULO MEDIO DE 0.3Y0.5mm ENCAPSULADOS	ABSCESO HEPATICO ENCAPSULADO
	27		1:40880	ABSCESO EN BORDE DE LOBULO DERECHO DE 0.3 mm.	ABSCESO HEPATICO ENCAPSULADO
	28		1:40880	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA
	29		1:40880	ZONA IRREGULAR EN LOBULO IZQUIERDO DE 0.3 mm. PROBABLE PUNCIÓN	PERIHEPATITIS EXTENSA
	30			AUTOLISIS	AUTOLISIS

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

En relación a la copa A-W-I Zimodomo II la tabla X presenta los resultados globales de las alteraciones histológicas presentes en el hígado cuando se utilizaron sus fracciones levigadas en forma protectora.

CEPA AHM-I

TABLA- X

FRACCIONES DE LA CEPA AHM-I	Nº DE ANIMALES INOCULADOS DURANTE 3 SEMANAS INTRAPERITONEALMENTE.	DESAFIO INTRA-HEPÁTICO CON SOCIOINOCULACIÓN EN mL DE LA CEPA AHM-I	ANTICUERPOS V.S. AHM-I	DESPUES DE 8 DIAS SE INVESTIÓ LOS RESULTADOS DE PRESENCIA DE ABSCESO	
				OBSERVACION MACROSCOPICA	OBSERVACION MICROSCOPICA
FRACCION I	1				
	2				
	3	0.1 ml.	NEGATIVO	PERIHEPATITIS FOCAL	PERIHEPATITIS FOCAL Y HEPATITIS REACTIVA
	4		NEGATIVO	ABSCESO DE 2.3 Y 1.7 cm. EN LOBULO MEDIO Y DERECHO Y DIAPHRAGMATICO	ABSCESO HEPATICO AMIBIANO
	5		NEGATIVO	S. A. M. I.	S. A. M. I.
6	1.40880		S. A. M. I.	HEPATITIS REACTIVA	
6	1.40880		S. A. M. I.	HEPATITIS AGUDA	
FRACCION II	7	0.1 ml.	NEGATIVO	ABSCESOS DE 0.3, 0.6 Y 0.7 cm. EN LOBULO MEDIO	ABSCESOS HEPATICOS AMIBIANOS
	8		NEGATIVO	ABSCESOS DE 2.8 Y 0.3 cm. EN LOBULO DERECHO	ABSCESO HEPATICO AMIBIANO
	9		NEGATIVO	ABSCESO EXTENSO QUE OCUPA 70% DE 3x1 cm. EN LOBULO MEDIO E INFERIOR	ABSCESO HEPATICO AMIBIANO
	10		1.160	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA
	11		1.40	TRAYECTO HEMORRAGICO NECROTICO	PERIHEPATITIS CRONICA INESPECIFICA
12	1.40	ABSCESO DE 2x1 cm. EN LOBULO DERECHO E IZQUIERDO	ABSCESOS HEPATICOS AMIBIANOS		
FRACCION III	13	0.1 ml.	1.40	ABSCESO EN LOBULO MEDIO DE HALO HEMORRAGICO 2 x 2.5 cm.	ABSCESO HEPATICO AMIBIANO
	14		1.80	S. A. M. I.	HEPATITIS REACTIVA
	15		1.160	MODULO HEMORRAGICO DE 0.3 cm.	PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA
	16		NEGATIVO	ABSCESOS EN LOBULO DERECHO DE 1.8 Y 1.7 cm. EN LOBULO IZQUIERDO DE 1x0.7 cm. HEMORRAGIA EXTENSA	ABSCESO HEPATICO AMIBIANO
	17		NEGATIVO	ABSCESO BIEN LIMITADO EN LOBULO MEDIO DE 0.4 cm.	ABSCESO HEPATICO AMIBIANO
18	NEGATIVO	NECROSIS HEMORRAGICA EXTENSA - ABSCESO EN LOBULO MEDIO DE 2.4 cm.	ABSCESO HEPATICO AMIBIANO		
FRACCION IV	19	0.1 ml.	1.160	PUNTO BLANQUECINO 0.3 cm LOBULO MEDIO AL CORTE	ABSCESO HEPATICO AMIBIANO
	20		NEGATIVO	ABSCESO DE 0.2 cm EN LOBULO MEDIO CABA INFERIOR	PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA
	21		NEGATIVO	S. A. M. I.	HEPATITIS GRANULOMATOSA
	22		NEGATIVO	PUNTO BLANCO BORDE ANTERIOR LOBULO MEDIO	PERIHEPATITIS Y PERICOLECISTITIS
	23		NEGATIVO	ABSCESOS EN LOBULOS MEDIO Y DERECHO DE 1.2 cm.	ABSCESO HEPATICO AMIBIANO
24	1.160	NECROSIS DE 1.3 x 1 cm. EN LOBULO MEDIO E INFERIOR	ABSCESO HEPATICO AMIBIANO EXTENSO		
FRACCION V	25	0.1 ml.	1.160	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA GRANULOMATOSA
	26		NEGATIVO	PUNTITO POR ARRIBA DE VESICULA BILIAR	HEPATITIS REACTIVA LEVE
	27		1.160	ABSCESO EN HEPATITIS CON NECROSIS DE 2.8x1.3 cm. ENTRE BAYO Y TABAS INFERIORES	ABSCESO AMIBIANO MESENTERICO
	27		1.160	MUCHOS MULTIPLES BLANQUECINOS IRREGULARES EN TODOS LOS LOBULOS, EL MAYOR DE 0.03 cm.	ABSCESOS HEPATICOS MULTIPLES AMIBIANOS
	28		1.160	INTESTINO-ABSCESO DE PARED DE 1.5 x 1.2 cm.	ABSCESO AMIBIANO DE PARED
	28		1.320	HIGADO - S. A. M. I.	HEPATITIS REACTIVA
	29		1.320	ABSCESOS ENTRE 0.1 Y 0.2 cm.	ABSCESOS HEPATICOS AMIBIANOS
30	1.320	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS FOCAL LEVE		
FRACCION VI	31	0.1 ml.	1.320	S. A. M. I.	MICROABSCESO NO AMIBIANO
	32		1.80	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA GRANULOMATOSA
	33		1.160	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS AGUDA Y CRONICA
	34		NEGATIVO	S. A. M. I.	PERIHEPATITIS FOCAL LEVE

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

La tabla XI muestra los resultados globales obtenidos de inmunizar con las fracciones proteicas obtenidas de la cepa HM-531 Zirodeno hartmanni después de ser desafiados con una amiba invasora.

CEPA HM-531

TABLA-XI

FRACCIONES DE LA CEPA HM-531	Nº DE ANIMALES INOCULADOS DURANTE 3 SEMANAS INTRAPERITONICAMENTE	DESARROLLO INTRAPERITONICO CON 300000 AMIBAS DE LA CEPA HM-531	ANTICUERPOS V.S. HM-531	DESPUES DE 8 DIAS SE INVESTIGO LOS RESULTADOS DE PRESENCIA DE ABSCESO	
				OBSERVACION MACROSCOPICA	OBSERVACION MICROSCOPICA
FRACCION I	1		1:40000	S. A. M. I.	ABSCESO EXTRAPERITONICO
	2		1:40000	S. A. M. I.	ABSCESOS HEPATICOS
	3	0.1 ml.	1:40000	NO DULO DE 0.2 mm. EN LOBULO MEDIO	ABSCESO HEPATICO PARACENTRAL ENCAPSULADO.
	4		1:20400	NO DULO DE 0.3 Y 0.1 mm. EN LOBULO MEDIO.	ABSCESO PERINEPATICO
	5		1:20400	AUTOLISIS	AUTOLISIS
	6		1:40000	FUNCION IRREGULAR EN LOBULO IZQUIERDO.	PERINEPATITIS LEVE
FRACCION II	7		1:40000	ABSCESO ROTO DE 0.8 mm. EN LOBULO MEDIO	ABSCESO HEPATICO
	8		1:40000	S. A. M. I.	PERINEPATITIS FOCAL Y HEPATITIS REACTIVA LEVE.
	9	0.1 ml.	1:2500	ABSCESO DE 0.6 mm. EN LOBULO DERECHO	ABSCESO EXTRAPERITONICO
	10		1:2500	S. A. M. I.	ABSCESO EXTRAPERITONICO
	11		1:2500	AUTOLISIS	AUTOLISIS
	12		1:2500	AUTOLISIS	AUTOLISIS
FRACCION III	13		1:2000	ZONA HEMORRAGICA 0.3 mm. EN LOBULO MEDIO	ABSCESOS HEPATICOS
	14		1:2000	HEMORRAGIA EN LOBULO IZQUIERDO	HEMORRAGIA IRREGULAR Y HEPATITIS REACTIVA
	15	0.1 ml.		AUTOLISIS	AUTOLISIS
	16			AUTOLISIS	AUTOLISIS
	17			AUTOLISIS	AUTOLISIS
	18			AUTOLISIS	AUTOLISIS
FRACCION IV	19		1:2500	S. A. M. I.	ABSCESO HEPATICO PROBABLEMENTE PIONERO.
	20		1:1200	S. A. M. I.	PERINEPATITIS AGUDA Y ONIACA
	21	0.1 ml.	1:2000	S. A. M. I.	S. A. M. I.
	22		1:2000	ABSCESO DE 0.2 mm. EN LOBULO MEDIO	ABSCESO HEPATICO ENCAPSULADO
	23		1:10200	S. A. M. I.	PERINEPATITIS MODERADA
	24			AUTOLISIS	AUTOLISIS
FRACCION V	25		1:10240	S. A. M. I.	PERINEPATITIS FOCAL
	26		1:2000	S. A. M. I.	PERINEPATITIS MODERADA
	27	0.1 ml.	1:2000	HEMORRAGIA PERIPLASMA 0.2 mm. EN LOBULO MEDIO.	ABSCESO HEMORRAGICO
	28		1:10240	ZONA HEMORRAGICA EN LOBULO DERECHO	PERINEPATITIS FOCAL Y COMBUSTION INTENSA.
	29		1:1200	ABSCESO DE 0.4 mm. EN LOBULO MEDIO	ABSCESO HEPATICO ENCAPSULADO
	30			AUTOLISIS	AUTOLISIS
FRACCION VI	31		1:9120	NO DULO HEMORRAGICO 0.3 mm. SUBCAPSULAR LOBULO MEDIO	ABSCESO HEPATICO ENCAPSULADO
	32		1:300	S. A. M. I.	PERINEPATITIS FOCAL LEVE
	33	0.1 ml.	1:100	HEMORRAGIA SUBCAPSULAR 0.3 Y 0.2 mm. EN LOBULO DERECHO	HEMORRAGICOS SUBCAPSULAR
	34		1:100	ABSCESO DE 0.3 Y 0.2 mm. EN LOBULO MEDIO DE OMBLIGO EN LOBULO DERECHO Y PERINEPATITIS FOCAL LEVE.	PERINEPATITIS PULSILTA EXTERNA Y HEMORRAGICOS MULTIPLES.
	35			AUTOLISIS	AUTOLISIS
	36			AUTOLISIS	AUTOLISIS
FRACCION VII	37		1:300	S. A. M. I.	HEMORRAGICO PROBABLEMENTE PIONERO
	38		1:100	NECROSIS SUBCAPSULAR EN LOBULO IZQUIERDO	NECROSIS SUBCAPSULAR Y PERINEPATITIS LEVE.
	39	0.1 ml.	1:100	S. A. M. I.	ABSCESO HEPATICO Y HEPATITIS REACTIVA
	40		1:100	HEMORRAGIA SUBCAPSULAR EN LOBULOS DERECHO E IZQUIERDO.	ABSCESO HEPATICO AGUDO Y NECROSIS COAGULATIVA MULTIFOCAL
	41			AUTOLISIS	AUTOLISIS
	42			AUTOLISIS	AUTOLISIS

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Finalmente la tabla XII nos representa los hallazgos histológicos de las lesiones hepáticas macroscópicas y microscópicas así como los títulos de anticuerpos obtenidos en todos y en cada uno de los animales inoculados correspondiendo estos resultados cuando las fracciones proteicas fueron aisladas de la cepa HMI-IMSS Zimodemo II.

CEPA HMI-IMSS

TABLA-XII

FRACCIONES DE LA CEPA HMI-IMSS	Nº DE ANIMALES INOCULADOS DURANTE 3 SEMANAS INTRADERMICAMENTE	DESAFIO INTRA-NERVICO CON SUCUDO AMBAS x ml. DE LA CEPA HMI-IMSS	ANTICUERPOS V.S. HMI-IMSS	DESPUES DE 8 DIAS SE INVESTIGO LOS RESULTADOS DE PRESENCIA DE ABSCESO	
				OBSERVACION MACROSCOPICA	OBSERVACION MICROSCOPICA
FRACCION I	1	0.1 ml.	1:20480	S . A . M . I .	PERINEPATITIS FOCAL
	2		1:20480	S . A . M . I .	S . A . M . I .
	3		1:20480	S . A . M . I .	S . A . M . I .
	4		1:20480	S . A . M . I .	S . A . M . I .
	5		1:10240	S . A . M . I .	S . A . M . I .
	6		1:20480	ZONA HEMORRAGICA EN LOBULO MEDIO	S . A . M . I .
FRACCION II	7	0.1 ml.	1:20480	S . A . M . I .	S . A . M . I .
	8		1:20480	S . A . M . I .	S . A . M . I .
	9		1:40960	NODULO DE 0.1mm.	PERINEPATITIS FOCAL
	10		1:40960	PUNCION .	S . A . M . I .
	11		1:40960	PUNCION .	PERINEPATITIS FOCAL
	12		1:10240	AUTOLISIS	AUTOLISIS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El análisis de las lesiones anatomopatológicas del hígado de acuerdo a los parámetros previamente establecidos se presentan en la tabla XIII donde se muestran los resultados obtenidos con las fracciones proteicas de la cepa Entamoeba chattoni PM-4.

TABLA-XIII

RELACION ENTRE LAS LESIONES HEPATICAS PRODUCIDAS POR
E. histolytica Y LA ACTIVIDAD PROTECTORA DE LAS FRACCIONES
PROTEICAS OBTENIDAS EN LA CEPA
PM-4 E. chattoni

FRACCION	ABSCESO	AMBAS	NECROSIS BASOFILA	ACTIVI- DAD EN BORRES	INPLA- NACION.	LINFO- CITOS	POLIMOR- FORNU- CLEARES	MACRO- FAGOS	CELULAS PLASMA- TICAS	FIBRO- BLASTOS	MICRO- ORGANIS- MOS	ESPERU- LAS	GRANU- LONAS	OTROS
F ₁	1/6	0/6	0/6	0/6	2/6	2/6	2/6	2/6	1/6	2/6	0/6	4/6	4/6	2/6
F ₂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	5/5
F ₃	1/6	1/6	0/6	0/6	1/6	1/6	1/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	3/6	3/6
F ₄	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5	4/5
F ₅	1/6	0/6	1/6	0/6	2/6	2/6	2/6	2/6	0/6	1/6	1/6	0/6	3/6	5/6
F ₆	3/6	1/6	1/6	1/6	3/6	3/6	3/6	3/6	0/6	2/6	1/6	1/6	3/6	5/6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los hallazgos de los resultados obtenidos de la evolución de las alteraciones histológicas después de -
 inmunizar con las fracciones proteicas de la cepa Entamoeba chattoni PM-5 y de desafiar con una amiba invaso-
 ra se presenta en la tabla XIV.

TABLA-XIV

RELACION ENTRE LAS LESIONES HEPATICAS PRODUCIDAS POR
E. histolytica Y LA ACTIVIDAD PROTECTORA DE LAS FRACCIONES
 PROTEICAS OBTENIDAS EN LA CEPA
 PM-5 E. chattoni

FRACCION	ABSCESO	AMIBAS	NECROSIS BANDFLA	ACTIVI- DAD EN SIFIDOS	INFLA- MACION	LINFO- CITOS	FILIPPO- FORM- CLEANES	MACRO- FAGOS	CELULAS PLASMA- TICAS	FIBRO- BLASTOS	MACRO- ORGAN- ISMOS	ESPERU- LAS	GRANU- LOSAS	OTROS
F ₁	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	1/6	2/6	2/6	5/6	5/6	5/6
F ₂	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	1/6	2/6	2/6	5/6	6/6	4/6
F ₃	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	2/6	3/6	5/6
F ₄	3/6	1/6	3/6	2/6	3/6	3/6	3/6	3/6	2/6	2/6	2/6	3/6	5/6	5/6
F ₅	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	1/6	2/6	2/6	2/6	4/6	4/6

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

En la tabla XV se presentan las lesiones hepáticas histológicas después de inmunizar con las fracciones proteicas de la cepa AHM-I Zimodemo II y desafiada con una ameba invasora.

TABLA-XV

RELACION ENTRE LAS LESIONES HEPATICAS PRODUCIDAS POR
E. histolytica Y LA ACTIVIDAD PROTECTORA DE LAS FRACCIONES
 PROTEICAS OBTENIDAS EN LA CEPA
 AHM-I Zimodemo II

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

FRACCION	ABSCESO	AMIBAS	NECROSIS GASIFLAC.	ACTIVIDAD EN SERIES	REPLACIMIENTOS	LINFOCITOS	POLIMORFONUCLEARES	MACROFAGOS	CELULAS PLASMATICAS	PIROPLASTOS	MICROORGANISMOS	ESPERULAS	GRANULOMAS	OTROS
F ₁	2/6	2/6	2/6	1/6	2/6	2/6	2/6	2/6	0/6	1/6	2/6	0/6	4/6	5/6
F ₂	4/6	4/6	4/6	3/6	4/6	4/6	4/6	4/6	0/6	1/6	4/6	2/6	1/6	3/6
F ₃	4/6	4/6	4/6	3/6	3/6	4/6	3/6	4/6	1/6	1/6	4/6	3/6	5/6	4/6
F ₄	2/6	2/6	2/6	1/6	2/6	2/6	2/6	1/6	0/6	0/6	2/6	3/6	3/6	2/6
F ₅	2/6	2/6	2/6	1/6	1/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6	2/6	2/6	5/6
F ₆	2/7	2/7	2/7	2/7	2/7	2/7	2/7	1/7	1/7	2/7	1/7	3/7	3/7	5/7

Así como en la tabla XVI se analizan las lesiones hepáticas producidas después de inmunizar con las fracciones proteicas utilizadas como antígenos protectores de la cepa HM-531 Zimodemo hartmanni y desafiadas con una amiba invasora.

TABLA-XVI

RELACION ENTRE LAS LESIONES HEPATICAS PRODUCIDAS POR E. histolytica Y LA ACTIVIDAD PROTECTORA DE LAS FRACCIONES PROTEICAS OBTENIDAS EN LA CEPA HM-531 Zimodemo HARTMANNI .

FRACCION	ABSCESO	AMIBAS	NECROSE BASOPLA	ACTIVIDAD EN BORDES	INFLAMACION	LINFOCITOS	POLIMORFO-NUCLEARES	MACROFIBROS	CELULAS PLASMATICAS	FIBROBLASTOS	MICROORGANISMOS	ESPERULAS	GRANULOMAS	OTROS
F ₁	4/6	1/6	4/6	4/6	4/6	4/6	4/6	3/6	2/6	3/6	0/6	2/6	5/6	6/6
F ₂	2/4	1/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	1/4	2/4	0/4	3/4	4/4	4/4
F ₃	1/2	0/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2	1/2	1/2	2/2	1/2
F ₄	2/5	0/5	1/5	2/5	2/5	1/5	2/5	1/5	0/5	1/5	2/5	4/5	3/5	4/5
F ₅	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	1/5	0/5	0/5	1/5	2/5	3/5
F ₆	3/4	0/4	3/4	3/4	3/4	3/4	3/4	3/4	1/4	3/4	1/4	4/4	4/4	4/4
F ₇	2/4	1/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	0/4	0/4	0/4	2/4	1/4	3/4	4/4

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Finalmente los resultados obtenidos con las fracciones proteicas de la cepa HMI-IMSS Zimodemo II utilizadas como antígenos de protección y las lesiones hepáticas histológicas producidas por la inoculación de una amiba invasora se presentan en la tabla XVII.

TABLA-XVII

RELACION ENTRE LAS LESIONES HEPATICAS PRODUCIDAS POR
E. histolytica Y LA ACTIVIDAD PROTECTORA DE LAS FRACCIONES
 PROTEICAS OBTENIDAS EN LA CEPA
 HMI-IMSS Zimodemo II

FRACCION	ABSCESO	AMIBAS	NECROSIS SABOFLA	ACTIVI- DAD EN BORRES	INFLA- MACION	LINFO- CITOS	POLEOR- FORU- CLEARES	MACRO-	CELULAS PLASMA- TICAS	PIRO- BLASTOS	MICRO- ORSA- RISIOS	ESPERU- LAS	GRANU- LOMAS	OTROS
F ₁	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6	3/6
F ₂	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	2/6

TESIS CON
 PALA DE ORIGEN

7.0.- DISCUSION.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el fraccionamiento proteico utilizado por Arroyo-Begovich (1) con la cepa HMI-IMSS Zimodemo II siguiendo una metodología por centrifugación diferencial pudimos observar que la cantidad en contenido proteico obtenida fue muy pequeña por lo que utilizamos otro tipo de metodología bioquímica que nos rindiese una mayor cantidad de proteínas extraídas.

Los resultados obtenidos con las dos cepas de primates correspondientes a Entamoeba chattoni cepas PM-4 y PM-5 mostraron diferencia en el número de fracciones obtenidas así como en sus concentraciones proteicas a pesar de que el número de amibas hubiese sido constante.

Lo mismo sucedió con las cepas de Entamoeba histolytica correspondientes a las cepas AHM-I, HM-531 Zimodemo hartmanni y HMI-IMSS Zimodemo II, en donde las concentraciones proteicas obtenidas fueron muy diferentes, en dos de ellas creemos que tuvimos una muy buena separación aunque con la cepa HMI-IMSS Zimodemo II la separación proteica no fue lo que hubiesemos esperado a pesar de que éste tipo de ensayo se llevó a cabo por triplicado.

Uno de los propósitos de este trabajo fue el investigar si en las fracciones proteicas obtenidas presentaban determinantes antigénicos semejantes a los presentes en una amiba invasora productora de un absce

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

so hepático amibiano, fue por ello que utilizamos diecisiete sueros de pacientes con absceso hepático amibiano y/o colitis amibiana con el objeto de determinar si presentaban una reacción cruzada.

El estudio histológico de las lesiones mostradas en las tablas correspondientes para cada cepa mostró - los siguientes resultados: Para la cepa PM-4 Entamoeba chattoni las fracciones I, II, IV y V fueron capaces - de proteger al desarrollo de un absceso hepático amibiano y además se observó que hubo una correlación con el título de anticuerpos presentes por parte de la cepa inductora de inmunidad. En el caso de las fracciones III y VI a pesar de que el título de anticuerpos - presentes era importante éstos no fueron capaces de - proteger ya que se observó la presencia de absceso hepático amibiano. Sin embargo, pudiesen explicarse estos resultados en el hecho de que estos anticuerpos - hubiesen sido formados contra determinantes antigénicos diferentes a los presentes y a los antígenos protectores.

En relación a los resultados obtenidos con la cepa PM-5 Entamoeba chattoni pudimos observar que solamente las fracciones I y V protegieron de la presencia de un absceso hepático amibiano y las fracciones II, - III y IV no fueron capaces de producir inmunidad protectora en el hámster.

A pesar de que en todos los casos había títulos - de anticuerpos importantes la explicación que encontramos es que probablemente no todos los determinantes -

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

antigénicos de las fracciones proteicas son capaces de producir inmunidad protectora.

Lo que dió como resultado que algunas fracciones fuesen negativas y otras dieran un título positivo. Los resultados son mostrados en las tablas correspondientes para cada una de las cepas de amibas estudiadas y en la tabla VI se presentan los resultados con el tratamiento estadístico de x^2 en donde pudimos observar que con la cepa HMI-IMSS Zimodemo II presentó un valor estadístico extraordinariamente significativo.

Así mismo el análisis de la correlación lineal entre el título obtenido con la fracción proteica aislada de cada una de las cepas y el de una amiba total frente al suero de pacientes con absceso hepático amibiano y/o colitis amibiana mostró que la cepa HMI-IMSS Zimodemo II y la cepa AHM-I Zimodemo II son las que presentaron valores estadísticamente significativos como se muestran en la tabla VII lo cual nos habla de un mayor número de determinantes antigénicos semejantes en esas dos cepas con respecto a una cepa invasora.

Jain (9) en 1980, así como Norman (16) en 1979, y Meerovich (14) en 1978 estudiaron la respuesta humoral a animales de laboratorio con cepas de Entamoeba histolytica determinando el título de anticuerpos presentes y su relación con las lesiones producidas en el hígado después de haber inoculado con una amiba invasora, encontrando resultados dispares en donde en ocasiones el título de anticuerpos no estaba en relación con la le-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

si3n producida en el hámster.

En nuestro estudio también determinamos el título de anticuerpos presentes, los resultados se muestran - en la Figura 6 en donde pudimos observar el diferente- grado de antigenicidad de las cinco cepas de amibas - estudiadas lo cual nos sugiere diferentes tipos de an- tígenos en cada cepa.

En relación a la cepa AHM-I Zimodemo II pudimos - observar que solamente en la fracción VI se presentó - una acción protectora correlacionándose éste con un - título alto de anticuerpos. Las demás fracciones no - fueron capaces de proteger a la presencia de un absce- so hepático amibiano probablemente en las fracciones - I, II y III por la ausencia de anticuerpos protectores ya que en éstas no hubo respuesta inmune. Sin embargo, con las fracciones IV y V el título de anticuerpos pro- tectores si estuvo presente lo que nos indica que los- anticuerpos formados estuvieran dirigidos a antígenos- no protectores.

En el caso de la cepa HM-531 Zimodemo hartmanni - pudimos observar que de la fracción I a la fracción - VI, fueron capaces de producir una inmunidad protecto- ra ya que no se presentó absceso hepático amibiano y - sí un título alto de anticuerpos con excepción de la - fracción VII en donde los anticuerpos presentes no - fueron capaces de proteger al absceso hepático amibia- no y esto lo interpretamos como en los casos antes ci- tados en donde en una cepa hay antígenos comunes o es-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

pecíficos pudiendo ser protectores o no.

Finalmente con la cepa HMI-IMSS Zimodemo II en las fracciones I y II dieron como resultado la formación de anticuerpos protectores ya que no hubo la presencia de absceso hepático amibiano en ninguno de los casos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.0.- CONCLUSIONES.-

Podemos decir que en este estudio se llevó a cabo la separación cromatográfica de cinco cepas de amibas- en donde tres de ellas corresponden a Entamoeba histolytica cepas AHM-I, HMI-IMSS Zimodemo II y la cepa HM-531 Zimodemo hartmanni, y dos de ellas a Entamoeba chattoni cepas PM-4 y PM-5.

En las cinco cepas de amibas estudiadas se obtuvieron fracciones proteicas en donde estaban presentes antígenos con determinantes específicos y compartidos- entre ellos y con una cepa que corresponde a una amiba invasora, esto fue corroborado.

Al tratar estos resultados desde el punto de vista estadístico, pudimos observar que algunas de las -- fracciones de las cepas de primates fueron compartidas con los determinantes antigénicos de una cepa de una - amiba invasora por lo que pensamos pudiesen ser utilizados como proteínas inductoras de inmunidad protectora. Así mismo de las fracciones obtenidas de las cepas de Entamoeba histolytica alguna de las fracciones proteicas fueron antígenos específicos los cuales pueden ser considerados como antígenos inductores de inmunidad.

Esto tiene importancia desde el punto de vista socioeconómico y de salud dado que la amibiasis en México representa uno de los problemas de salud pública - más importante para nuestro país, por ello creemos que el utilizar antígenos protectores pudiese ayudar a - - erradicar la amibiasis en México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.0.- BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- Arroyo-Begovich, A.: Simposio: Inducción de inmunidad protectora anti~~amibiana~~ con "nuevos" antígenos en el hámster lactante. Arch. Invest. Méd. - (Méx) 9 (Supl. 1): 311, 1978.
- 2.- Becerra, E., Minvielle, L., Colorado, F.: Consideraciones sobre mil casos de enfermos con amibiasis intestinal. Rev. Invest. Clin. 1952, 4. 193--201.
- 3.- De la Torre, M., Tanimoto-Weki, Chávez, B., Aislamiento y caracterización de cepas de E. histolytica obtenidas de portadores. VIII Seminario de amibiasis, México, D.F., 1979, p. 25.
- 4.- Faust, E.C., Rusell, P.F. Clinical Parasitology.- 7 th Edit. B. Lea and Febiger. Philadelphia, - - 1964. 25-30.
- 5.- Faust, E.C.,: A critical study of chemical laboratory technics for the diagnosis of protozoa cysts and heminith eggs en feces. Am. J. Trop. Med. - - 1938, 18, 81-84.
- 6.- Gutiérrez, G.: Manual de Infectología, 6a. Ed. - Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, México, 1978, 56-66.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 7.- Harris, E.G., : Bray. R.S.: Amoebiasis in a rural-African community: Preliminary results on the - - epidemiology of infection in the gambia, West - - Africa. Conferencia internacional de amibiasis. - Centro de Estudios sobre amibiasis. México, 1975, 728-734.
- 8.- Hoare, C.A.: Parasitological Reviews, The comen--sal phase of Entamoeba histolytica, Exp. Parasit. 1952, 1, 411-415.
- 9.- Jain, P., S.Saw Hney and V.K.Vinayak,: Experimen--tal amoebic infection in guinea pigs immunized - with low grade amoebic infection. Tran.of the Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg. 1980, Vol. 74, No. 3.
- 10.- Kumate, J., Aranda, E.: Enfermedades diarreicas - en el niño. 5a. Ed. Ediciones médicas del Hospi--tal Infantil de México. México, 1978. 236-246.
- 11.- Kreier, J.P.: Parasitic protozoa. New York: Acade--mic Press, 1978. 2: 455-489.
- 12.- Krupp, I.: Experimental induction of protective - immunity to amoebic infection. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 1973, 5 (Supl. 2): 415.
- 13.- Masood, Alam and sohail Ahmad: Immunogenicity of- Entamoeba histolytica antigen fractions Trans. of the Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. 1974, Vol. - 68 No. 5.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 14.- Meerovich, E., Hartman, D.P., Ghadirian, E.: Protective immunity and possible autoimmune regulation in amebiasis. 1978. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1978, 1, 147-252.
- 15.- Myjak, Przemyslaw.: Comparative studies of the antigenic properties of some indigenous and imported strains of Entamoeba histolytica. Biulletin - of the Institute of Marine Medicine in Gdansk. - 1970, No. 3/4. Vol. XXI.
- 16.- Norman, Lois.: The serologic response of Hamsters to experimental liver inoculations with Entamoeba histolytica as measured by indirect hemagglutination test and enzyme linked immunosorbent assay.- Am. J. Trop. med. Hyg. 1979, 28 (2), 198-205.
- 17.- Reeves, R.E., Bischoff, J.M.: Clasification of Entamoeba species by means of electrophoretic properties of amoebal enzymes. Journal of Parasitology, 1968, 54, 594.600.
- 18.- Robinson, G.L.: The laboratory diagnosis of human parasitic amoeba. Trans. of the Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg., 1968, 62. 285-294.
- 19.- Rodríguez Díaz, E.: Enfermedades diarreicas en el niño. 5a. Ed. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. México, 1978, p. 35-43.
- 20.- Sargeaunt, P.G.: Confirmation of amoebic cyst - chromatoids by stain after Ridleys faecal concentration. Trans. of the Roy. Soc. of Trop. Med. - and Hyg. 1962, 56, 12-14.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 21.- Sargeaunt, P.G., Williams, J.E.: The differentiation of invasive and non invasive E. histolytica by isoenzyme electrophoresis. Trans. of the Roy.- Soc. Trop. Med. and Hyg. 1978, 72, 519-521.
- 22.- Sargeaunt, P.G., Williams, Kumate, J. Jiménez, E.: The epidemiology of Entamoeba histolytica in México city. A pilot survey I. Trans. of the Roy. - Soc. Trop. Med. and Hyg., 1980, 74, 653-656.
- 23.- Sargeaunt, P.G., Williams, J.E.: Electrophoretic- isoenzyme patterns of the pathogenic non-pathogenic intestinal amoebae of man. Trans. of the - - Roys. Soc. of Trop. Med. and Hyg. 1979, 73, 225-227.
- 24.- Sepúlveda, B.: La amibiasis invasora por Entamoeba histolytica. Gaceta médica de México, 1970. - 100. 101-253.
- 25.- Vinayak, V.K., Sunita Saavhney, P. Jain S. Chugh, S.R. Naik and R.N. Chakravarti.,: Virulence of - Entamoeba histolytica in rat and its comparison - with the serological responses of the amoebic - - patients. Trans. of the Roy. Soc. of the Trop. - Med. and Hyg., 1981, Vol. 75 No. 1.-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA