

PARTICIPACION DE ENZIMAS LISOSOMALES EN LA PATOGENIA DEL ABSCESO HEPATICO AMIBIANO

AGUSTÍN SOSA,¹ ALFONSO BERNAL,¹ ALEJANDRO REYES¹ y ADOLFO
ROSADO¹

Se demuestra la capacidad de las amibas de liberar al medio enzimas histolíticas semejantes a las enzimas lisosomales y se especula sobre el papel que tal actividad pueda tener en la patogenia del absceso hepático.

Se estudian las actividades de enzimas lisosomales en diferentes compartimientos celulares del tejido hepático normal y en el pus del absceso hepático amibiano y se considera la posibilidad de una participación preponderante de enzimas hidrolíticas procedentes de las amibas o de los leucocitos en el desarrollo del absceso, señalándose que no es posible explicar

la gran actividad lítica presente en relación al número demostrable de amibas o en relación a la potencial infiltración leucocitaria.

Finalmente se presenta la hipótesis de que el absceso hepático amibiano se produce por la iniciación de un proceso autolítico sucesivo, provocado por la labilización y/o ruptura de los lisosomas de la célula hepática, inducido por una sustancia idéntica o al menos semejante a la ya descrita por otros autores y producida por *Entamoeba histolytica*. (Gac. Méd. Méx. 101: 759, 1971.)

A PESAR DE LOS numerosos estudios realizados sobre las enfermedades causadas por la *Entamoeba histolytica*, los factores que gobiernan la patogénesis de las lesiones producidas son todavía mal conocidos. Desde 1919, se ha postulado que la penetración del parásito a través del epitelio intestinal se debe a la secreción, por

la amiba, de enzimas histolíticas, sin embargo, a pesar del tiempo transcurrido, no existen datos experimentales concluyentes, que indiquen la realidad de este hecho.^{1, 2}

Aunque se ha demostrado que *Entamoeba histolytica* posee actividad proteolítica,³ peptidásica,⁴ y hialuronidásica,² no es posible, actualmente, fundamentar una hipótesis patogénica basada en el estudio de estas peculia-

¹ Departamento de Investigación Científica, Instituto Mexicano del Seguro Social.

ridades, puesto que algunas especies no patógenas, poseen la actividad proteolítica,⁵ mientras que algunas cepas patógenas no poseen actividad de hialuronidasa.² Particularmente en relación a la producción de necrosis hepática, la ausencia de un número adecuado de trofozoítos para explicar la magnitud del daño tisular,⁶ parecería indicar la existencia de otros factores coadyuvantes que determinarían la amplitud de la lisis.⁷ Por esta causa, pareció indicado emprender una investigación sobre la participación de las enzimas lisosomales de las amibas mismas, de los leucocitos y de otro tipo de células infiltrantes, y del parénquima hepático afectado, en la producción de la extensa citolisis requerida para la formación del absceso.

Material y métodos

Todas las determinaciones se hicieron de manera paralela en una muestra de pus de absceso hepático amibiano y en homogenizado de hígado humano y normal, obtenido por biopsia transoperatoria en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional.

Las muestras de hígado fueron homogenizadas en dos veces su volumen de cloruro de sodio 0.14 M ajustado a pH 7.0 en un homogenizador coaxial de tipo Potter-Elvehjem con émbolo de teflón.

El pus de absceso hepático extraído por punción de pacientes hospitalizados en el Servicio de Gastroenterología del Hospital General en el Centro Médico Nacional del Instituto Mexi-

cano del Seguro Social y el homogenizado de hígado normal, fueron mantenidos a 4°C hasta su utilización, la cual se realizó en el menor tiempo posible. Para facilitar su manipulación, el pus de absceso hepático se mezcló 1:3 con cloruro de sodio 0.14 M ajustado a pH 7.0.

Con el fin de obtener una estimación de la actividad libre, precipitable y total de las enzimas lisosomales cuantificadas, el pus de absceso hepático diluido y el homogenizado de hígado normal se dividieron en tres alícuotas.

La primera alícuota fue mezclada a partes iguales con una solución de sacarosa 0.25 M a pH 7.0 y fue centrifugada en una centrifuga refrigerada International modelo HR-1 a 25,500 xg durante 30 minutos. El sobrenadante fue cuidadosamente transferido a otro tubo y el precipitado resuspendido en la misma solución y centrifugado a la misma velocidad, por igual tiempo. Las determinaciones practicadas en la mezcla de estos sobrenadantes, fueron consideradas como la estimación de la actividad libre, no sedimentable de las enzimas lisosomales consideradas.

La segunda alícuota se mezcló a partes iguales con solución amortiguadora de acetatos 0.2 M pH 4.5 y enseguida, la mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos y se centrifugó a 68,000 xg durante 60 minutos. En el sobrenadante de esta segunda fracción, se determinó la actividad libre, a la cual, nosotros llamamos actividad libre intralisosomal. El precipitado de esta segunda fracción, fue resuspen-

dido al mismo volumen de la solución original con solución amortiguadora de acetatos 0.2 M pH 4.5 conteniendo bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) al 0.3%; la suspensión se homogenizó en un homogenizador Potter-Elvehjem con émbolo de teflón durante tres minutos y enseguida se congeló y descongeló rápidamente en tres ocasiones. Finalmente, se centrifugó a 68,000 xg durante 60 minutos y en sobrenadante, se determinó la actividad de enzimas lisosomales fijadas al sistema membranoso.

Las determinaciones practicadas en cada uno de los tres sobrenadantes obtenidos fueron: proteínas por el método de Lowry modificado;⁸ actividad de β -glucuronidasa, por el método de Fishman modificado;⁹ actividad de fosfatasa ácida, por el método de Lowry *et al.*,¹⁰ actividad de arilsulfatasa ácida, por el método de Dodgson,¹¹ actividad proteolítica, catepsinas ácidas, por la modificación propuesta por Lovtrup¹² al método de Pechman;¹³ y actividad de desoxirribonucleasa (DNAsa) ácida, por la utilización combinada de los métodos de Allfrey y Mirsky¹⁴ y Burton,¹⁵ este último modificado por Giles y Myers.¹⁶ La tercera y última alícuota del pus, se mezcló a partes iguales con una solución de CTAB al 0.3%, se homogenizó y se centrifugó a 25,500 xg durante 30 minutos. El sobrenadante de esta tercera fracción se utilizó para la determinación de arginasa, por el método de Van Slike y Archibald;¹⁷ y actividad de fosfatasa alcalina, por el método de Lowry *et al.*,⁹ ya que se sabe

que la presencia de sacarosa, interfiere con la determinación de urea producida durante la actividad de arginasa.

El estudio de la liberación al medio de actividades hidrolíticas por *Entamoeba histolytica*, se llevó a cabo en cultivo de trofozoítos en medio monoxénico con *Bacteroides symbiosum*.¹⁸ La cepa de amibas utilizada en este estudio, fue proporcionada por el Laboratorio de Gastroenterología del Hospital General, Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social, y es la denominada TAHM, procedente de material de absceso hepático amibiano. Los cultivos de 24, 48 y 72 horas, fueron procesados como sigue: después de contar el número de trofozoítos por medio de un hemocitómetro, la fase líquida de los cultivos fue centrifugada a 38,000 x g durante 30 minutos, el sobrenadante de esta centrifugación fue recentrifugado en la misma forma y el sobrenadante final, considerado libre de trofozoítos y bacteroides, fue ensayado de la manera ya descrita, para determinar la actividad de β -glucuronidasa, catepsinas y desoxirribonucleasa ácidas; las actividades se expresaron por mililitros de medio de cultivo y se correlacionaron con el número de trofozoítos presentes por milímetro cúbico. (Fig. 1). Este procedimiento se realizó también en cultivos puros de *Bacteroides*, para determinar la liberación de enzimas hidrolíticas por estos microorganismos.

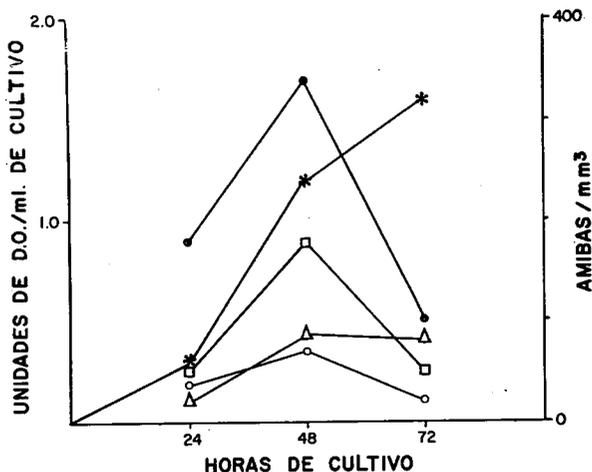
Es de hacer notar, que de todas las enzimas estudiadas, se hizo un cuida-

doso estudio cinético para tener la seguridad de que, en todos los casos, la enzima se encontraba en condiciones óptimas.

Resultados

Cuando se calcularon las actividades enzimáticas ensayadas por gramo

el absceso son considerablemente menores que en el tejido hepático normal. (Fig. 2). No obstante, la actividad residual encontrada, varió de manera considerable para las diferentes enzimas; desde este punto de vista las enzimas ensayadas se pueden dividir en cuatro grupos:



* AMIBAS mm³
 □ DNasa ACTIVIDAD DE 24 HORAS
 △ CAATEPSINA ACTIVIDAD DE 24 HORAS
 ○ β-GLUCURONIDASA ACTIVIDAD DE 24 HORAS
 ● FOSFATASA ACIDA ACTIVIDAD DE 30 MINUTOS

FIG. 1. Actividad de enzimas hidrolíticas en el sobrenadante del cultivo de *E. histolytica*. Para incorporar la actividad de las 4 enzimas estudiadas en una sola gráfica se indica la actividad en unidades de densidad óptica por ml de cultivo en el tiempo indicado en la figura. Cada punto es el promedio de 4 a 5 determinaciones individuales.

de hígado, o por ml de pus de absceso hepático, se encontró que, invariablemente, las actividades enzimáticas en

En el primero quedaría únicamente la catepsina, que retiene el 60% de su actividad en el tejido hepático nor-

mal, a pesar de las grandes alteraciones tisulares y citológicas producidas durante el desarrollo del absceso. En el segundo grupo, colocaríamos la β -glucuronidasa y la desoxirribonucleasa ácida, cuya actividad residual es de

están formados por enzimas lisosomales y es notable señalar que la catepsina y la desoxirribonucleasa ácida que retienen un por ciento mayor de su actividad, son las que poseen normalmente una menor actividad libre, y se

ACTIVIDAD DE PUS DE ABSCESO HEPATICO

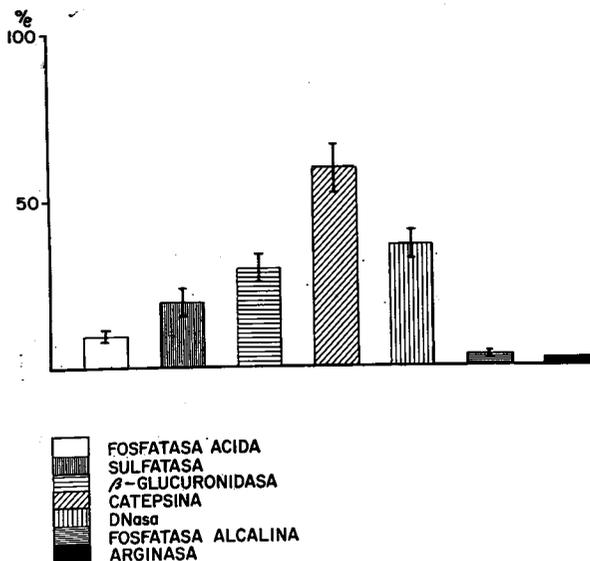


Fig. 2. Actividad enzimática residual en el pus de absceso hepático. Para la presente gráfica se ha calculado la actividad total de las enzimas lisosomales adicionando las actividades encontradas en cada una de las fracciones estudiadas. Las actividades se expresan como porcentaje de la actividad demostrable en el hígado humano normal, procesado de la misma manera. Cada barra representa el promedio de 6 a 8 determinaciones más o menos una desviación tipo. Todas las diferencias con el hígado normal son altamente significativas.

aproximadamente una tercera parte de la del hígado normal. Como tercer grupo, la sulfatasa ácida y la fosfatasa ácida, cuya actividad residual es sólo del 10 al 20%. Todos estos grupos

encuentran particularmente fijadas a la membrana lisosomal. Finalmente, el cuarto grupo, que comprende las enzimas no lisosomales, es aquél en que la actividad conservada en el pus del

absceso es casi nula (1.7 - 3.6%) en relación con su actividad en el hígado normal.

La distribución de las actividades de hidrolasas ácidas en las diferentes fracciones separadas en los tejidos estudiados, se hallan representadas en la figura 3, para el hígado humano

diferentes fracciones se han expresado como porcentos de esta actividad total.

En la figura 3 se observa la notable diferencia que existe entre la distribución de las actividades enzimáticas estudiadas en el hígado normal. La fosfatasa ácida presenta su mayor

HIGADO HUMANO

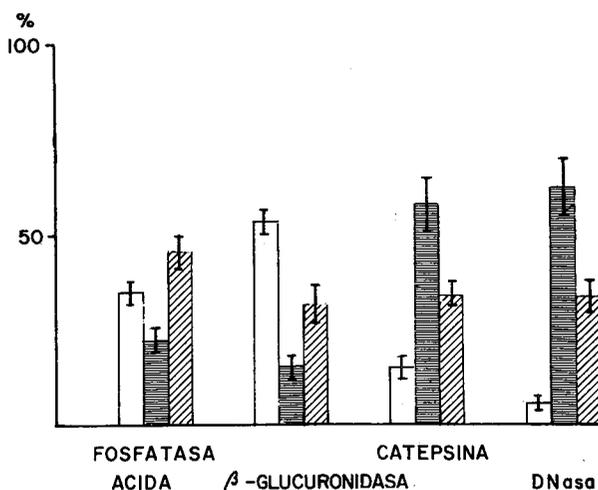


FIG. 3. Distribución intracelular de las enzimas lisosomales en el hígado normal. Cada actividad enzimática está representada por un grupo de 3 barras de las cuales representa la actividad libre, la actividad libre intralisosomal, y la actividad intralisosomal fija a la membrana. La actividad libre intralisosomal se obtuvo mediante la sustracción de la actividad libre de la obtenida en el sobrenadante después de producir la ruptura de los lisosomas (Fracción 2, ver texto). La distribución está expresada como porcentaje de la actividad total. Cada barra representa el promedio de 6 a 8 determinaciones más o menos una desviación tipo.

normal y en la figura 4 para el pus de absceso hepático. En ambos casos la actividad total de cada enzima, en el tejido estudiado, se ha tomado como el 100% y las actividades en las

actividad en la porción fija a la membrana lisosomal, la actividad libre de la enzima es también importante. Aunque la actividad de sulfatasa ácida no se ha representado en la figura, su dis-

tribución porcentual es prácticamente igual a la de la fosfatasa ácida. La β -glucuronidasa es notable por presentar la mayor parte de su actividad libre; en este caso como en el de las dos enzimas anteriores, debe recordarse que se ha descrito la presencia de estas enzimas en organelos diferentes de los lisosomas, lo cual explicaría la gran cantidad de "actividad libre" encontrada.^{19, 20}

En contraste, se observa que la ac-

tante de actividad enzimática fija a membranas, que constituye aproximadamente el 35% para todas las enzimas estudiadas.

En la figura 4 pueden verse los notables cambios observados en la distribución de estas enzimas en el pus del absceso; la mayoría de la actividad de las cinco enzimas ensayadas, está completamente libre y en el caso de la fosfatasa ácida, sulfatasa y β -glucuronidasa, sólo traza de actividad

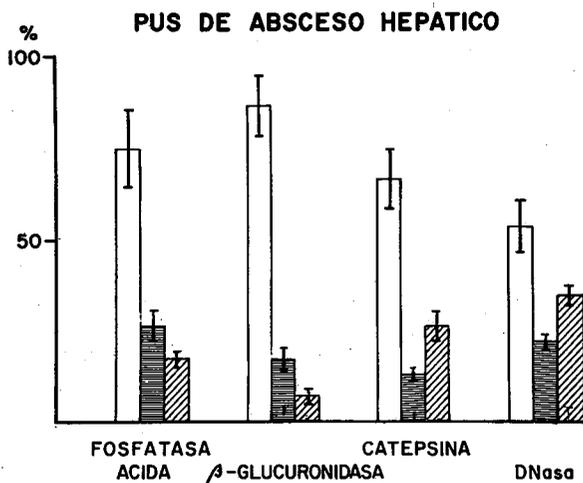


Fig. 4. Distribución de las enzimas lisosomales en el pus del absceso hepático. (Ver Figura 3).

tividad de catepsina y desoxirribonucleasa ácida, se encuentra fundamentalmente localizada en lo que hemos llamado "actividad libre intralisosomal" y fija a la membrana, mientras que la actividad genuinamente libre es casi nula y podría ser debida a contaminación. Un hecho que debe mencionarse es la proporción casi cons-

fija a los lisosomas pudo ser demostrada.

Sin embargo, debe mencionarse que la proporción de catepsina y desoxirribonucleasa ácida fija a la membrana lisosomal no se modificó; esto se interpretaría como prueba de que los lisosomas están presentes, pero rotos, y fundamentalmente, de que la fijación

de las diferentes enzimas a la membrana lisosomal varía para cada una de ellas,²¹ y de que, aun en un proceso tan destructivo como éste, en que la mayoría de las estructuras celulares se han perdido, se mantiene preferentemente la estructura lisosomal, una cosa semejante a la que encontramos en relación a la preservación de actividades enzimáticas (Fig. 2).

Nuestro interés fundamental en los estudios de cultivo de amibas, fue el demostrar la liberación de enzimas lisosomales al medio, durante el crecimiento de amibas. Es notable la similitud en el comportamiento de las enzimas estudiadas, las cuales aumentan en su actividad de las 24 a las 48 horas del cultivo y después, disminuyen dramáticamente de las 48 a las 72 horas, a pesar de que el número de amibas por mm³ aún está aumentando durante este tiempo. Los sobrenadantes de los cultivos puros de *Bacteroides* realizados en el mismo medio, no mostraron ninguna de las actividades enzimáticas, en cantidades demostrables por la metodología utilizada.

Discusión

Sepúlveda,²² así como Biagi *et al.*²³ han señalado recientemente la alta prevalencia de la amibiasis en nuestro país, particularmente del absceso hepático amibiano, así como el conocimiento limitado que se tiene sobre los factores condicionantes y los mecanismos patogénicos comprendidos en las alteraciones patológicas producidas por *Entamoeba histolytica*. Ha sido demostrado que no es posible fijar una distinción clara entre diversas cepas

de este parásito, consideradas tanto patógenas como no patógenas, en virtud de sus patrones enzimáticos,^{2, 5} haciéndose referencia particularmente al contenido de actividades hidrolíticas o lisosomales del protozoario.

En un artículo reciente, se ha hecho nuevamente hincapié, en las dificultades que se tienen para demostrar la presencia del parásito en el material obtenido del absceso hepático, señalándose que aun con técnicas especiales, la demostración de la presencia del trofozoíto puede realizarse solamente en una pequeña minoría de los casos.⁶ Estos hallazgos, junto con los señalados anteriormente acerca de las dificultades encontradas para demostrar la presencia de trofozoítos en el tejido que rodea al absceso,²⁴ parecen indicar que los factores determinantes de la producción y mantenimiento del absceso hepático no dependen de la actividad lítica de las mismas amibas.

Las características del daño producido, permiten suponer que las partículas llamadas lisosomas por De Duve *et al.*²⁵⁻²⁷ desempeñan un papel importante en la génesis del absceso. Tres posibles orígenes de la actividad lítica lisosomal requerida, pudieran ser señaladas: las amibas mismas; los leucocitos y otros tipos de células que infiltran el tejido hepático durante la formación del absceso y finalmente, las células hepáticas mismas mediante un proceso de autólisis.

La riqueza en lisosomas del tejido hepático y de los leucocitos, ha sido señalada repetidamente en la literatura; no así, al menos tan claramente, la presencia o cantidad de estos organe-

los o de las enzimas hidrolíticas mismas, en las amibas.^{2, 4} Por este motivo se decidió empezar el presente estudio con la cuantificación de ciertas enzimas hidrolíticas en el medio de cultivo de *Entamoeba histolytica* (Fig. 1). Si se pudiera concluir que la producción del absceso depende estrictamente del poder histolítico de la amiba, esta actividad debería estar relacionada con la liberación al medio de las enzimas capaces de producir la hidrólisis hepática. Por tal motivo, se prefirió estudiar la actividad de enzimas hidrolíticas en el medio de cultivo, más que en las amibas mismas.

El medio de cultivo presenta, efectivamente, actividad de las enzimas hidrolíticas cuantificadas (Fig. 1), pero esta actividad, cuando se expresa por mililitro de cultivo, resulta ser extraordinariamente menor (aproximadamente 30 veces) que la encontrada en el pus del absceso hepático. No obstante, si se calcula la actividad por amiba presente en el medio de cultivo y se compara con la cantidad de células presentes en un gramo de tejido hepático (180 millones),³¹ se puede concluir que la actividad de enzimas hidrolíticas liberadas por amibas es considerablemente superior a la contenida en una célula hepática normal y sería fácil atribuirle al parásito la facultad de producir la lisis del tejido hepático, si hubiera alguna posibilidad de demostrar claramente el número de amibas presentes en o alrededor del absceso.

La ausencia de actividad hidrolítica en los cultivos puros de *Bacteroides symbiosum*, permite asegurar que las

enzimas liberadas al sobrenadante, son producidas fundamentalmente por la amiba. Sin embargo, debe mencionarse que nuestros resultados no están de acuerdo con la ausencia de actividad proteolítica señalada por Jarumilinta y Kradolfer³² en el sobrenadante de cultivos de *E. histolytica*. Aunque la causa de esta diferencia en resultados no es clara, podría deberse a los distintos sistemas de cultivo, que en nuestro caso permiten un crecimiento adecuado del parásito, mientras que en el caso de Jarumilinta y Kradolfer limitan la reproducción de la amiba.³²

Antes de que sea factible adjudicar a la mera acción hidrolítica de las enzimas lisosomales del protozoario la producción de la lisis hepática, pensamos que son necesarios estudios más pormenorizados de la velocidad de crecimiento de un absceso, así como una cuantificación más precisa de las amibas presentes durante el proceso patológico.

En 1964 Jarumilinta y Kradolfer describieron la presencia en *E. histolytica* de un factor que produce un efecto tóxico en los leucocitos de varias especies animales estudiadas, entre ellas el hombre.³² Tal efecto tóxico, parece manifestarse por la producción de una rápida y extensa lisis de los gránulos citoplásmicos. Los autores postulan que la liberación de enzimas hidrolíticas podría causar la digestión de los elementos estructurales de los leucocitos y finalmente producir un daño celular generalizado y la muerte.

Aunque se ha mencionado la presencia de infiltración leucocitaria alre-

dedor de la zona de necrosis del absceso hepático,³³ y la presencia de leucocitosis importantes en estos pacientes, el estudio histopatológico realizado por Reddy y Subramanyam²⁴ y el practicado con microscopia electrónica por Treviño-García Manzo *et al.*³⁴ indican la ausencia de reacción inflamatoria acentuada así como la ausencia relativa de granulocitos con gran número de células mononucleares y macrófagos. Además, en el trabajo de Treviño-García Manzo *et al.*³⁴ se señala que en el seno del absceso hepático las células hepáticas se encuentran generalmente destruidas, mientras que los polimorfonucleares encontrados se hallaban íntegros o poco dañados. Estos datos no parecen apoyar la hipótesis de que el absceso hepático podría ser producido por la lisis *in situ* de granulocitos causados por el agente tóxico descrito por Jarumilinta y Kradolfer,³² o por lo menos que no es éste el único mecanismo presente. Nuestros resultados parecen indicar que existe una participación preponderante de enzimas hidrolíticas liberadas por ruptura de lisosomas en la génesis del absceso hepático (Fig. 4). La dificultad de explicar esta actividad en relación a la presencia de las amibas mismas o en relación a la potencial infiltración leucocitaria, parecerían indicar que tal actividad lítica procede principalmente de la célula hepática misma. Esta hipótesis se afirma por la presencia de una actividad de catépsina, que es sólo 50% menor que la encontrada en el parénquima hepático normal (Fig. 2). La liberación de una cantidad de en-

zima semejante requeriría la presencia de una infiltración granulocítica o ambiana masiva.

Para explicar el mecanismo por el cual los lisosomas de la célula hepática se rompen para provocar la autólisis masiva del parénquima, se podría invocar la actividad de una substancia idéntica, o al menos semejante, a la descrita por Jarumilinta y Kradolfer³² que indujera la lisosomólisis en el hepatocito. Los resultados presentados por Rosado *et al* parecerían apoyar esta hipótesis.

Parece importante hacer hincapié finalmente, en la notable persistencia de las actividades líticas, lisosomales en un ambiente en el cual otras enzimas, como la fosfatasa alcalina y la arginasa han prácticamente desaparecido. (Fig. 2). Este hallazgo seguramente indica cierta relación estructura-función, mediante la cual este tipo de enzimas que necesariamente deberán existir en un ambiente activamente proteolizante, están constituidas por una estructura primaria, secundaria y terciaria que las hace resistentes a las enzimas catépticas. Aparentemente, la fijación a la membrana lisosomal es trascendente en este sentido, puesto que la catépsina y la desoxirribonucleasa, ambas preferentemente unidas a la membrana lisosomal (Fig. 3), son las enzimas que mejor preservan su actividad en el seno de la necrosis hepática.

REFERENCIAS

1. Dobell, C.: London, John Bale, Son and Danielsson, 1919.
2. Jarumilinta, R. y Maegraith, B. G.: *Enzymes of Entamoeba histolytica*. Bull. WHO. 41: 269, 1969.

3. Harinasuta, C. y Maegraith, B. G.: *Demonstration of proteolytic enzyme activity of Entamoeba histolytica by the use of photographic gelatin films*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 52: 508, 1958.
4. Jarumilinta, R. y Maegraith, B. G.: *I. The patterns of some proteolytic enzymes of Entamoeba histolytica and Acanthamoeba sp.* Ann. Trop. Med. Parasitol. 55: 505, 1961.
5. Jarumilinta, R. y Maegraith, B. G.: *II. The patterns of some proteolytic enzymes of Entamoeba histolytica and Acanthamoeba sp.* Ann. Trop. Med. Parasitol. 55: 518, 1961.
6. Aubanel, M.; De la Torre-Robles, M. y Sepúlveda, B.: *Trofozoitos de Entamoeba histolytica en material de absceso hepático en pacientes*. Arch. Invest. Med. (Méx.). (Supl. 1): 27, 1970.
7. Biagi, F. F.; Robledo, E.; Servin, H. y Martucelli, Q.: *The effect of cholesterol on the pathogenicity of Entamoeba histolytica*. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 11: 333, 1962.
8. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J.: *Protein measurement with folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193: 265, 1951.
9. Fishman, W. H. y Bernfeld, P.: *Glucuronidases*. En: Colowick, S. P. y Kaplan, N. O. (Eds.). *Methods in Enzymology*. Academic Press. New York, 1955. Vol. 1 p. 262.
10. Lowry, O. H.; Roberts, N. R.; Wu, M. L.; Hixson, U. S. y Crowford, E. J.: *The quantitative histochemistry of brain. II. Enzyme Measurements*. J. Biol. Chem. 207: 19, 1954.
11. Dodgson, K. S. y Spencer, B.: *Assay of Sulfatases*. En: Glick, D. (Ed.). *Methods of Biochemical Analysis*. New York and London, Interscience 1957. Vol. 4 p. 211.
12. Lovtrup, S.: *Lovtrup adaptation of the pechman color-liberation method for cathepsin and trypsin*. En: Glick, D. (Ed.). *Quantitative Chemical Techniques of Histo-and-Cytochemistry*. New York Intersciences Publishers John Wiley and Sons. Vol. II p. 157, 1963.
13. Pechman, E. V.: *Über die enzymatische Hydrolyse von Xanthoproteinen und deren Verwendung zur kolorimetrischen Bestimmung proteolytischer Fermente*. Biochem. Z. 321: 248, 1950.
14. Allfrey, A. y Mirsky, A. E.: *Some aspects of the deoxyribonuclease activities of animal*. J. Gen. Physiol. 36: 227, 1952.
15. Burton, K.: *A study of the conditions and mechanism of the DPA reaction for the colorimetric estimation of DNA*. J. Biochem. 62: 315, 1956.
16. Giles, K. W. y Myers, A.: *An improved DPA method for the estimation of DNA*. Nature. 206: 93, 1965.
17. Van Slike, D. D. y Archibald, P. M.: *Gasometric and photometric measurement of arginase activity*. J. Biol. Chem. 165: 293, 1946.
18. Shaffer, J. G. y Frye, W. W.: *Studies on the growth requirement of Entamoeba histolytica. I. Maintenance of a strain of Entamoeba histolytica through one hundred transplant in the absence of an actively multiplying bacterial flora*. Amer. J. Hyg. 47: 214, 1948.
19. Barret, A. J.: *Properties of lysosomal enzymes*. En: Dingle, J. D. y Fell, H. B. (Eds.). *Lysosomes in Biology and Pathology*. Amsterdam. North-Holland Publishing Co. 1969. Vol. 2 p. 243.
20. Neil, M. W. y Horner, M. W.: *Studies on acid hydrolases in adult and foetal tissues. I. Acid p-nitrophenyl phosphated phosphohydrolases of adult Guinea-pig liver*. Biochem. J. 92: 217, 1964.
21. Lucy, J. A.: *Lysosomal membranes*. En: Dingle, J. D. y Fell, H. B. (Eds.). *Lysosome in Biology and Pathology*. Amsterdam - London. North - Holland Publishing Co. 1969. Vol. 2, p. 313.
22. Sepúlveda, B.: *Introducción al Seminario sobre Amibiasis*. Arch. Invest. Med. (Méx.). Supl. 1: 5, 1970.
23. Martucelli, A.; Robledo, E.; Navarrete, F.; Santoyo, J. y Biagi, F. F.: *Frecuencias de las parasitosis intestinales en México*. Rev. Med. Hosp. Gral. 23: 579, 1960.
24. Reddy, D. G. y Subramanyam, K.: *Amebic liver abscess. Histopathological changes with reference to: a) the nature of connective tissue reaction; b) distribution of amebae*. Indian. J. Med. Sci. 16: 203, 1962.
25. De Duve, C.; Pressman, B. C.; Gianetto, R.; Wattiaux, R. y Appelmans, F.: *Tissue fractionation studies. I. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue*. Biochem. J. 60: 604, 1955.
26. De Duve, C.; Pressman, B. C.; Gianetto, R. y Appelmans, F.: *Subcellular Particles*. Hayashi, T. (Ed.). New York Pergamon Press. 1959.
27. De Duve, C.: *Lysosomes. (Ciba Symposium) The Lysosome Concept*. Reuck, A. V. S. y Cameron, M. P.

- (Eds.). Boston, Mass. Little Brown and Co., 1963.
28. Novikoff, A. B.; Beaufay, H. y De Duve, C.: *Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver*. J. Biophys. Biochem. Cytol (Supl.). 2: 179, 1956.
 29. Cohn, Z. A. y Hirsch, J. D.: *The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphonuclear leucocytes*. J. Exp. Med. 112: 983, 1960.
 30. Frankland, D. M. y Wynn, C. H.: *The degradation of acid-soluble collagen by rat liver preparations*. Biochem. J. 85: 276, 1962.
 31. Weber, G. y Morris, H. P.: *Comparative biochemistry of hepatomas. III. Carbohydrate enzymes in liver tumors of different growth rates*. Cancer. Res. 23: 987, 1963.
 32. Jarumilinta, R. y Kradolfer, F.: *The toxic effect of Entamoeba histolytica on leucocytes*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 58: 375, 1964.
 33. Sánchez-Yllades, L. y García, G. M.: *La importancia del estudio del biotoprograma en los abscesos hepáticos amibianos*. Rev. Med. Hosp. Gral. 25: 315, 1962.
 34. Treviño-García, M. N.; De la Torre, M.; De Sánchez, I. R.; Hernández, H. L. y Escobedo, A.: *Morfología de Entamoeba histolytica en el absceso hepático del hamster*. Arch. Invest. Med. (Méx.). 1: (Supl. 1), 51, 1970.