



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES IXTACALA**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FAGOCITOSIS
EN DOS CLONAS DE *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*
DE DIFERENTE VIRULENCIA**

T E S I S

que para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

TERESA OLGUIN TREJO

MEXICO, D. F.

1984



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.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I. P. N. bajo la dirección de la Dra. Esther Orozco Orozco.

La investigación fue apoyada económicamente por BECA AVON.

A la Dra. Esther Orozco por la dirección
y colaboración en la realización de es-
te trabajo.

A quien fomento en mi el interés por el
estudio y deseo de superación.

A la memoria de mi padre.

Con cariño a mi madre y hermanos.

Con amor a mi esposo y a Nydia.

A todos los integrantes del Lab. 8 de
Génética y Biología Molecular.

Biol. Guillermina

Biol. Fidel

Biol. Miguel

Biol. Jorge

Q.B.P. Thomas

Sr. Fernando

Agradezco al Sr. Catarino Villeda por
su colaboración en el trabajo de dibujo.

ABREVIATURAS .-

TY1-S-33	Tripticasa, extracto de levaduras, hierro-suero. Medio de Diamond para cultivo axénico de <u>E. histolytica</u> (Diamond <u>et al</u> , 1978).
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0
S S	Solución salina isotónica 0.85%
NAG	N- acetilglucosamina
PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonil
BSA	Albúmina sérica de bovino
YM-1	Medio para levaduras
DA ₅₀	Dosis absceso medio
ConA	Concavalina A

FIGURAS Y TABLAS

- Tabla I. Virulencia de Entamoeba histolytica.
- Tabla II. Eventos morfológicos en la eritrofagocitosis de E. histolytica.
- Tabla III. Efecto de la Citocalasina B sobre la fagocitosis de E. histolytica.
- Tabla IV. Efecto de la Citocalasina B sobre la adhesión y formación de casquete en E. histolytica.
- Tabla V. Prueba de t "student".
- Tabla VI. Tamaño de eritrocitos de diferentes especies.
- Tabla VII. Aglutinación de eritrocitos de diferentes especies por extractos de E. histolytica.
- Figuras 1 y 2 Adhesión de eritrocitos de humano a la superficie de trofozoítos de E. histolytica.
- Figuras 3 y 4 Formación de casquete de eritrocitos humanos en la superficie de E. histolytica.
- Figuras 5 y 6 Formación de casquete de eritrocitos humanos en la superficie de E. histolytica.
- Figuras 7 y 8 Trofozoítos de E. histolytica con eritrocitos ingeridos.
- Figura 9 Adhesión y fagocitosis entre trofozoítos y eritrocitos de humano.

- Figura 10 Adhesión y fagocitosis entre trofozoítos y eritrocitos de hámster.
- Figura 11 Adhesión y fagocitosis entre trofozoítos y eritrocitos de conejo.
- Figura 12 Adhesión y fagocitosis entre trofozoítos y eritrocitos de cuyo.
- Figura 13 Adhesión y fagocitosis entre trofozoítos y eritrocitos de rata.
- Figura 14 Fagocitosis de levaduras Kluyveromices lactis por E. histolytica.
- Figura 15 Indices de fagocitosis de levaduras Kluyveromices lactis por E. histolytica.
- Figura 16 Fagocitosis de esferas de látex por E. histolytica.
- Figura 17 Indices de fagocitosis de esferas de látex por E. histolytica.

I N D I C E

I. RESUMEN -----	1
II. INTRODUCCION -----	3
1.- Historia -----	3
2.- Clasificación Taxonómica -----	4
3.- Ciclo de vida -----	4
4.- Trofozoíto -----	5
5.- Quistes -----	6
6.- Factores que intervienen en la invasión de <u>E. histolytica</u> -----	7
7.- Determinantes de virulencia -----	9
8.- Papel de las protefínas tipo lectinas en la adhesión de los microorganismos a la célula blanco -----	10
9.- Fagocitosis -----	13
III. OBJETIVOS -----	16
IV. MATERIAL Y METODOS -----	17
V. RESULTADOS -----	26
VI. DISCUSION Y CONCLUSION -----	56
VII. APENDICE -----	64
VIII. BIBLIOGRAFIA -----	66

RESUMEN

El objetivo general de este trabajo fue realizar un estudio comparativo de la fagocitosis de las clonas A y L-6 de E. histolytica aisladas ambas a partir de la cepa HM1:IMSS y con diferentes grados de fagocitosis y virulencia.

La virulencia de las cepas amibianas se determinó cuantitativamente por medio de la obtención de la DA_{50} , siendo la clona A cuando menos 20 veces más virulenta que la clona L-6 aún usando inóculos de 3×10^6 .

Los pasos de la fagocitosis, fueron estudiados desde el punto de vista morfológico. Fue posible distinguir claramente tres eventos: adhesión, formación de casquete e ingestión de partículas. La comparación de los pasos de la fagocitosis de las clonas A y L-6 mostró, que mientras la adhesión es igualmente eficiente en ambas clonas, el movimiento de los eritrocitos en la superficie de la clona L-6 es más lento que en la clona A tanto a $37^{\circ}C$ como a $22^{\circ}C$. Por lo tanto, la deficiencia en la velocidad de fagocitosis de la clona L-6 se presenta tanto en la formación de casquete de los eritrocitos sobre la superficie amibiana, como en la velocidad de introducción de los eritrocitos al citoplasma.

Cuando los experimentos se realizaron con citocalasina B el porcentaje de inhibición de la fagocitosis a $37^{\circ}C$ fué de 57%. En la cinética de adhesión y formación de casquete a $22^{\circ}C$ no se observaron diferencias significativas cuando los experimentos se realizaron con y sin citocalasina B.

En los ensayos de adhesión y fagocitosis de eritrocitos de diferentes especies, tanto la clona A como la clona L-6 presentaron en general semejante eficiencia de adhesión entre sí aunque esta varía de especie a especie. La velocidad de fagocitosis de la clona A fue mayor que la de la clona L-6 en todos los casos probados y también varió en cada clona dependiendo de la especie.

La actividad hemaglutinante de los extractos amibianos de las clonas A y L-6 fue semejante entre sí para las diferentes especies de eritrocitos que se probaron, aunque varió también de especie a especie; mostrando correlación directa con la eficiencia de adhesión a excepción de los eritrocitos humanos en los que la adhesión y fagocitosis fueron altas pero la hemaglutinación fue baja.

Para estudiar la participación de los receptores de NAG en el proceso de fagocitosis, se utilizaron dos tipos de levaduras de la cepa Kluyveromices lactis, la cepa silvestre con una gran cantidad de residuos de NAG en su pared y su mutante deficiente en NAG. La eficiencia de fagocitosis fue mayor cuando se utilizaron levaduras Kluyveromices lactis cepa silvestre en tanto que esta fue menor para las levaduras cepa mutante deficientes en NAG en la pared celular. En este caso, los trofozoítos de la clona A presentaron mayor eficiencia de fagocitosis, en tanto que la clona L-6 resultó nuevamente menos eficiente.

En la fagocitosis de esferas de látex los trofozoítos de la clona A presentaron una mayor eficiencia de fagocitosis por esferas de látex en tanto que la ingestión de partículas fue menor por la clona L-6.

INTRODUCCION.-

La amibiasis es la infección del ser humano, producida por el protozooario Entamoeba histolytica. Se presenta en zonas templadas en donde predomina la forma asintomática, mientras que en las zonas tropicales son más frecuentes las formas severas. (Elsdon, 1968).

1.- Historia

Los primeros estudios sobre amibiasis fueron efectuados por - Fedor Aleksandrevitch Lesch en 1875. Hasta esa fecha nada se sabía acerca de la existencia de un organismo parásito del hombre en coincidencia con el conjunto de síntomas que caracterizan a la disentería amibiana. Lesch efectuó estudios en un paciente de Arkangel (Rusia) que sufría de disentería crónica asociada con la presencia de amibas en sus evacuaciones, llegando a la conclusión de que los - - cuerpos móviles encontrados en las heces eran amibas de una especie nueva (Martínez, 1975). Kartulis en 1890 reportó la existencia de amibas en veinte casos de absceso hepático (Brandt y col. 1970). En 1891, Councilman y Lauffer proporcionaron descripciones patológicas y clínicas de disentería amibiana y del absceso hepático (Brandt y col. 1970). Quincke y Ross en 1893 descubrieron el ciclo evolutivo de la amiba diséntérica con la transformación de sus trofozoítos en quistes. Huber en 1903 precisó los caracteres diferenciales de los quistes de E. histolytica y F. coli conocidas hasta entonces como - parásitos en el intestino humano. Schaudinn, (1903) fijó con precisión los detalles estructurales de E. histolytica (Martínez, 1975). Walker y Sellards, (1913) conclusivamente demostraron que Entamoeba

coli era no patógena y E. histolytica era patógena, (Martínez-Palomo, 1982).

2.- Clasificación Taxónomica.

Phylum	Protozoa
Subphylum	Sarcomastigophora
Superclase	Sarcodina
Clase	Rhizopoda
Orden	Amoebida
Familia	Entamoebidae
Género	<u>Entamoeba</u>
Especie	<u>Entamoeba histolytica</u> (Faust y col. 1975)

3.- Ciclo de Vida

Entamoeba histolytica presenta una fase vegetativa y otra quística, siendo ésta última la que le permite propagarse a otros hospederos. El enquistamiento se lleva a cabo en la luz del intestino; el trofozoíto se divide por fisión binaria dando lugar a amibas más pequeñas las cuales se caracterizan por ser lentas y se conocen como formas prequísticas. Esta forma, secreta una pared resistente y se enquista; el quiste es esférico y adicionalmente contiene glucógeno difuso y cuerpos cromatoides. Durante el proceso de madurez del quiste el material alimenticio es metabolizado y el núcleo presenta divisiones mitóticas dando lugar a la formación de 4 núcleos característicos del quiste maduro (estado metaquístico) siendo esta la forma infectiva de huésped a huésped (Kudo, 1976; Faust y col. - 1975).

4.- Trofozoito.

Se han descrito dos formas diferentes de trofozoitos de E. histolytica; la forma no invasiva que mide de 10-20 μm de diámetro, habita en la cavidad del tracto gastrointestinal y aparentemente no produce daño al huésped. La forma invasiva mide de 20-50 μm de diámetro y algunos autores han propuesto que se origina de la forma no invasiva, es capaz de penetrar en los tejidos y se caracteriza por la gran ingestión de eritrocitos, (Noble y Noble, 1976).

El citoplasma del trofozoito está bien diferenciado en un ectoplasma hialino y endoplasma granuloso, cuando se encuentra en cultivos axénicos, pero cuando la amiba procede de un hospedero presenta además vacuolas con eritrocitos, leucocitos, bacterias, etc. (Martínez-Palomo, 1982).

La forma trófica o trofozoito al desplazarse presenta polaridad con uroide en la región posterior, demostrada por microscopía electrónica por Martínez-Palomo y col. (1974). El movimiento de la amiba es irregular asociado con pseudópodos, el tipo y rapidez del movimiento dependen de la consistencia del medio que le rodea, edad del parásito, temperatura, variedad de la amiba, estado de tratamiento del huésped y muchos otros factores.

El núcleo es vesicular de unos 3-5 μm de diámetro, según el tamaño de la amiba, la membrana nuclear presenta en el interior granos finos de cromatina. En el centro del núcleo existe un endosoma de unos 0.5 μm de diámetro que consiste en un gránulo de cromatina, rodeado por una zona clara o halo, y algunas veces líneas

radiales de el endosoma a la membrana nuclear, (Cervantes, 1980).

La organización submicroscópica de el citoplasma de trofozoítos de E. histolytica está caracterizada por la ausencia de muchos de los organelos diferenciados encontrados en células de metazoarios; por ejemplo, no se han identificado mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, centriolos, ni microtúbulos - (Martínez-Palomo, 1982). El citoplasma está ocupado por una población heterogénea de vesículas limitadas por membrana y vacuolas de tamaños variables que van de 0.5-0.9 μm de diámetro, muchas de ellas se forman a partir de regiones invaginadas de la membrana plasmática a través de varias formas de endocitosis como micropinocitosis, macropinocitosis y fagocitosis. El contenido de las vacuolas citoplásmicas de E. histolytica varía, ya que en trofozoítos que crecen bajo condiciones axénicas, las vacuolas aparecen en su mayor parte vacías; mientras que en amibas que crecen en cultivos monoxénicos se presentan en ellos fragmentos celulares, y en amibas obtenidas de lesiones se presentan eritrocitos y células epiteliales en varios estadios de lisis celular, (Martínez-Palomo, 1982).

La membrana plasmática esta cubierta externamente por un glucocalix de .02-.03 μm de espesor compuesto de mucopolisacáridos y glucoproteínas (Carosi, 1976).

5.- Quistes.

Los quistes, generalmente esféricos, pueden medir de 5 a 20 μm de diámetro y están recubiertos por una pared de 0.5 μm de espesor;

recián formados tienen un solo núcleo grande, en todo semejante al de los trofozoítos, pero al evolucionar, este núcleo se divide en dos y éstos a su vez por otra división producen cuatro núcleos pequeños, característicos del quiste maduro, los núcleos mantienen su estructura y la cantidad original de cromatina.

6.-Factores que intervienen en la invasión de E. histolytica.

De las fases del ciclo de E. histolytica el trofozoíto es la fase invasiva y el quiste la infectiva.

Aparentemente el desenquistamiento es influenciado por enzimas digestivas del huésped, la cantidad de alimento ingerido y la velocidad del tránsito intestinal. Los trofozoítos pueden desarrollarse solamente bajo condiciones de muy baja tensión de oxígeno (potencial redox de -350 a -450 mV) éstas condiciones, son encontradas en el colon, por lo tanto su desarrollo ocurre principalmente en este sitio (Piekarski, 1959). Otros autores proponen que la flora intestinal bacteriana juega un papel importante en la propagación de las amibas por medio de la disminución del potencial redox (Phillips y col. 1955). Sin embargo, en la mayoría de los casos de amibiasis intestinal aguda los intestinos están libres de bacterias patógenas (Biagi - F y Beltrán - H, 1969).

Se ha propuesto que la amiba puede pasar a través de la mucosa intestinal por medio de su movilidad probablemente facilitada por enzimas (Biagi - F- y Beltrán -H, 1969; Muñoz y col, 1982). Otro factor reportado como importante para la producción de absceso hepático en pacientes con amibiasis intestinal es el incremen

to de colesterol en sangre o hepático (Bos y Van de Griend, 1977; Neal y Stewart, 1970).

La capacidad de E. histolytica para producir necrosis en tejidos se conoce desde el siglo pasado, aunque el mecanismo a través del cual ejerce ésta acción no ha sido esclarecido del todo. En los últimos años se han ofrecido demostraciones directas de la actividad proteolítica de esta amiba en sustratos como gelatina, caseína, hemoglobina, fibrina y células de epitelio cecal de cuyo, - (Jarumilinta y Maegraith, 1961) recientemente se ha descrito que E. histolytica posee también actividad colagenolítica Muñoz y col. (1982).

Estudios posteriores han demostrado que leucocitos vivos de origen humano y en contacto con trofozoítos móviles de E. histolytica experimentan rápidas transformaciones morfológicas que los conducen a la muerte celular (Jarumilinta y Kradolfer, 1964).

Algunos autores proponen que las cepas virulentas de E. histolytica pueden destruir células de mamífero por simple contacto, ocurriendo después un engolfamiento gradual o completo de éstas - (Eaton, 1969). Esta actividad citolítica aparentemente no es debida a productos tóxicos liberados en el medio, sino que el efecto primario es explicado por la presencia en la superficie amibiana de lisosomas modificados como agentes de agresión externa, Eaton y col. (1970).

McCaul y Bird (1977) realizaron estudios del efecto citopático de E. histolytica sobre células en cultivo. De acuerdo a sus observaciones el daño celular causado por las amibas es precedido

por el contacto entre las membranas de ambas células.

Otros autores explican el mecanismo de agresión de las amibas patógenas sin implicar necesariamente el contacto de éstas con la célula blanco. Griffin y Juniper (1972) proponen que el mecanismo de agresión de las amibas se lleva a cabo por medio de la liberación de sustancias líticas. Chévez y Segura (1974) en estudios de la interacción de trofozoítos de E. histolytica con leucocitos de varias especies concluyeron que la acción citolítica de las amibas sobre las células se ejerce a distancia, por medio de sustancias tóxicas difusibles.

Chévez y col. (1972) hacen mención a la formación de una placa filopódica en la región de contacto de la amiba con el leucocito y posteriormente el vaciamiento del contenido de vesículas que provienen del citoplasma amibiano, en la zona de contacto.

Diferentes cepas presentan distintos grados de virulencia; se ha reportado que la virulencia puede ser disminuida por subcultivación o incrementada por enquistamiento, ó pasos sucesivos en animales (Bos, 1975; Lushbaugh y col., 1978). La transmisión frecuente y natural en una población humana puede también incrementar la virulencia de ciertas cepas, esta es una posible explicación para la alta incidencia de amibiasis severa en algunas regiones.

7.- Determinantes de virulencia.

La patogenicidad ha sido descrita como la capacidad de los microorganismos para producir enfermedad en huéspedes animales o plantas. Los productos microbianos responsables para este proceso son

los determinantes de virulencia, y muchos de ellos son componentes de superficie (Smith, 1977). En E. histolytica la mayoría de estos determinantes desconocen. Sin embargo se sabe que el contacto entre el trofozoíto y la célula blanco es un requisito para que se dispare el mecanismo de agresión. Por tanto, el estudio de la superficie amibiana así como el de la célula huésped aportarán datos importantes para la localización y caracterización de las moléculas de superficie involucradas en la adhesión.

8.- Papel de las proteínas tipo lectinas en la adhesión de los microorganismos a la célula blanco.

En la arquitectura y función de la superficie celular participan un tipo de proteínas semejantes a las lectinas vegetales que se asocian específicamente a moléculas de carbohidratos y si éstos carbohidratos se encuentran en la superficie de otras células causan su aglutinación. Debido a que la aglutinación es selectiva, las lectinas son valiosas como pruebas para identificación y mapeo de los azúcares y glicoproteínas de la superficie celular y el estudio de la participación de estas glicoproteínas en fenómenos como la adhesión.

Hasta la fecha más de 50 lectinas han sido purificadas y caracterizadas químicamente, muchas de ellas han sido aisladas de plantas. Moléculas con características químicas de lectinas se han encontrado en la superficie de virus, bacterias y protozoarios parásitos. Existe evidencia, sobre todo en bacterias y virus de que algunas de estas proteínas tipo lectinas median la adhesión entre el microorganismo y la célula huésped y que en éste primer even

to de la relación huésped parásito la superficie tanto del microorganismo, como de la célula huésped juega un papel determinante.

Ofek y col. (1977) han sugerido que la unión de E. coli a células epiteliales es mediada por una proteína tipo lectina que presenta afinidad por receptores de manosa. Mirelman y col. (1980) - han reportado la propiedad de cepas bacterianas para unirse a receptores que contienen manosa tales como las manosas de las levaduras. En muchos casos la presencia de actividad de lectina en la superficie bacteriana no es determinante para colonizar la mucosa ya que su adherencia puede ser mediada por otros factores de colonización.

Burrows y col. (1976) describieron en cepas de Escherichia coli la presencia del antígeno de superficie K 99 y por microscopía electrónica determinaron que se presenta como estructuras filamentosas de superficie las cuales tienen capacidad de adhesión al epitelio intestinal.

En cepas virulentas de Streptococcus pyogenes que presentan la característica de adherirse al epitelio de la garganta produciendo infecciones como la faringitis, Ellen y Gibbons, (1972) determinaron que los estreptococos del grupo A poseen en su superficie unas proyecciones denominadas fimbrias, las cuales tienen un antígeno específico llamado M y que es el responsable de la adhesión de este microorganismo a las células epiteliales. Por otro lado, Ofek y col. (1975) propusieron que el ácido lipoteicoico expuesto en la superficie de los estreptococos y unido a las fimbrias, participa en la adhesión.

En virus la adhesión a la membrana plasmática es el primer -

evento del proceso de replicación, por lo tanto los componentes de superficie son esenciales en el proceso inicial de adhesión y penetración a la célula huésped. Los carbohidratos están covalentemente unidos a las glucoproteínas y glucolípidos virales y se sabe - participan directamente en los procesos de adhesión en la infección viral (Strauss y col, 1970).

En el caso de ortomixovirus y paramixovirus los receptores de membrana han sido caracterizados como glucoproteínas, con oligosacáridos terminales con 6-alfaN-acetilgalactosamina (Compans y Hans-Dieter, 1979). El virus de la influenza presenta actividad de aglutinación en eritrocitos. En estudios efectuados por Compans y Hans-Dieter (1979) se determinó que esta hemaglutinación es causada por una de las glucoproteínas de la envoltura viral denominada HA.

En protozoarios el evento de adhesión está poco estudiado y en la mayoría de los casos se desconocen los factores moleculares implicados en él. Hill y col. (1981) determinaron en ensayos de microaglutinación y fluorescencia la afinidad de varios tipos de lectinas por carbohidratos de superficie en Giardia lamblia, observando en general una deficiencia de aglutinación para las lectinas probadas.

Brown y col. (1975) sugirieron la presencia de receptores manosa en la superficie de Acanthamoeba castellani por la formación de agregados de las amibas en presencia de la lectina Con A.

Triss y col (1977) han reportado algunas propiedades de superficie de E. histolytica, observando una correlación de la patogenicidad de varias cepas de Entamoeba con la susceptibilidad a ser aglutinadas por Con A.

Bracha y col. (1982) demostraron la presencia de receptores manosa en la superficie de E. histolytica. Kobiler y Mirelman, (1980) encontraron una actividad de lectina en extractos amibianos totales de E. histolytica que aglutina eritrocitos humanos y es inhibida por oligosacáridos de N-acetilglucosamina. Estos autores han sugerido que la lectina amibiana podría participar en la adhesión.

García-Rivera y col. (1982) por medio de la obtención de clones de E. histolytica con deficiencia en adhesión a eritrocitos humanos sugirieron que la lectina amibiana, parece estar implicada en la adhesión de los trofozoítos tanto a eritrocitos como a células epiteliales en cultivo. Por otra parte Orozco y col. (1982) demostraron que la adherencia de trofozoítos de E. histolytica a células epiteliales es inhibida por oligómeros de N-acetilglucosamina. En otros estudios Ravdin y Guerrant (1981) muestran que la adherencia amibiana a células de la línea CHO y su posterior lisis requiere de receptores con afinidad por N-acetilgalactosamina.

De los reportes de la literatura mencionados anteriormente queda claro que en E. histolytica como en otros microorganismos el estudio de la superficie celular y en particular de las proteínas tipo lectinas aportarán datos importantes para conocer las moléculas que participan en la adhesión a la célula blanco en la relación huésped-parásito.

9.- Fagocitosis.

Desde que Losch describió la naturaleza hematófaga de E. his-

tolytica, la ingestión de eritrocitos humanos por parte de los trofozoítos es uno de los criterios biológicos para reconocer a la amiba en las lesiones que produce en el organismo humano y se le relaciona con la capacidad patógena del microorganismo (Chévez y col. 1974). La eritrofagocitosis ha sido considerada tradicionalmente como uno de los criterios más importantes para identificar trofozoítos patógenos de E. histolytica.

Por otra parte Orozco, (1978) sugirió que el mecanismo de agresión de cepas patógenas de E. histolytica, es dependiente del contacto entre las membranas plasmáticas del parásito y de la célula blanco con la subsecuente fase de daño celular y propone el fenómeno de fagocitosis como la última fase del efecto citopático.

Se ha considerado a la fagocitosis como un factor importante en la virulencia, sin embargo, se ha sugerido que la adhesión es un evento indispensable en el mecanismo de agresión de la amiba a la célula huésped; por lo tanto para que la fase de ingestión se realice eficientemente es importante que se efectúe la adhesión (Orozco y col. 1982).

A partir de la cepa HMI: IMSS considerada como muy virulenta y eritrófaga, Orozco, (1981) aisló una clona deficiente en fagocitosis, la clona L-6 la cual fue caracterizada como no virulenta. Se sabe que la clona L-6 presenta una eficiencia de adhesión a eritrocitos semejante a la de la cepa silvestre HMI: IMSS. Por lo que es claro que la deficiencia en fagocitosis mostrada por la clona L-6 se localiza en una fase posterior a la adhesión, sin embargo no se han estudiado otros eventos del proceso de fagocitosis pa

ra definir la deficiencia de esta clona.

Un estudio más detallado de la fagocitosis de la clona L-6 en comparación con la de la clona A (Orozco, 1981) que fue aislada - también a partir de la cepa HMI: IMSS y es altamente fagocítica y virulenta aportaría datos importantes para el estudio del fenómeno de fagocitosis y su relación en la virulencia de las cepas amibianas.

Objetivos.-

El objetivo general de este trabajo fue el de obtener mayores evidencias sobre la especificidad de la adhesión y fagocitosis de Entamoeba histolytica.

Objetivos particulares.-

a) Medir cuantitativamente la virulencia de las clonas A y L-6 de E. histolytica determinando la dosis absceso medio (DA_{50}) por medio de la inoculación intraportal de trofozoítos de hámsters jóvenes.

b) Caracterización de los eventos morfológicos en la fagocitosis en las fases de adhesión, formación de casquete e ingestión por E. histolytica.

c) Determinar si los trofozoítos de las clonas A y L-6 presentan afinidad específica por células que presentan diferentes receptores en la superficie celular, estudiando:

1.- La adhesión y fagocitosis a eritrocitos de diferentes especies.

2.- La adhesión y fagocitosis a levaduras Kluyveromices lactis cepa silvestre y su mutante carente de N-acetilglucosamina (NAG) en su superficie.

3.- La fagocitosis de material inerte (esferas de látex).

4.- Y por último determinar la actividad hemaglutinante de los trofozoítos de las clonas A y L-6 con eritrocitos de diferentes especies.

MATERIAL Y METODOS

1.- Cultivo de trofozoítos de Entamoeba histolytica.

Trofozoítos de las clonas A y L-6 se cultivaron en condiciones axénicas a 37°C en medio TY1-S-33 descrito por (Diamond et al 1978), suplementado con, 15% de suero bovino, inactivado previamente a 56°C durante 30 min en un baño de agua, 3% de la mezcla de vitaminas de Diamond, 0.25 UI/ml de penicilina y 35 µg/ml de estreptomycin. Los tubos con cultivos de trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento, se incubaron en agua-hielo durante 5 a 10 min, para despegar las células de las paredes del tubo. Se agitaron suavemente y las amibas se sembraron con pipetas estériles de 1 ml en tubos de 16 x 125 mm con tapa de rosca, que contenían 10 ml de medio TY1-S-33, más 2 ml de la mezcla de suero, vitaminas y antibióticos. Los inóculos se calcularon, de acuerdo al crecimiento de las cepas amibianas, para obtener, 2.5, 5 y 10×10^3 amibas por tubo.

2.- Obtención de eritrocitos.

La sangre humana se obtuvo por punción venosa, utilizando una jeringa estéril de 5 ml con solución de Alsever (Garvey y col. 1977) (100 µl de la solución/ml de sangre). La muestra se pasó a un tubo de 16 x 125 mm con tapa de rosca en condiciones de esterilidad. Se centrifugó a 1000 x g durante 10 min para separar los eritrocitos del plasma y de otros elementos celulares de la sangre. Posteriormente los eritrocitos, se lavaron tres veces con solución de Alsever por centrifugación a 1000 x g durante 10

min. Los eritrocitos se conservaron en medio TY1-S-33 en refrigeración por no más de 5 días.

Para la obtención de eritrocitos de hámster, rata y cuyo, los animales se anestesiaron con cloroformo, y se llevó a cabo la paratoma amplia para localizar la vena cava inferior de la que se tomó la muestra de sangre, utilizando una jeringa estéril de 5 ml con solución de Alsever (100 μ l de solución/ml de sangre). La sangre de conejo se obtuvo colocando el animal en una caja de madera con una salida para la cabeza, y se colectó de la oreja en un tubo estéril de 16 x 125 mm que contenía solución de Alsever. Las muestras se trataron de la misma forma que se describió anteriormente para obtener eritrocitos humanos.

3.- Determinación de la virulencia de E. histolytica.

La virulencia de las clonas A y L-6 se determinó por inoculación intraportal de trofozoítos en hámsters jóvenes de aproximadamente 100 gr de peso, de acuerdo a la técnica descrita por Reintson y Thompson (1951) modificada por Tsutsumi y Anaya (comunicación personal). Los hámsters se pesaron, y se anestesiaron por vía intraperitoneal con Anestesal (Norden Mex) se utilizó 1 ml de Anestesal por c/ 100 gr de peso a partir de una solución diluída 1:10. Los animales se colocaron en una tabla de disección y se les rasuró la región ventral para realizar la laparatomía y localizar la vena porta. Los trofozoítos se inocularon intraportalmente en 0.5 ml de medio TY1-S-33 con una jeringa de 1 ml. Al terminar la inoculación se cosió la incisión en dos planos, el muscular y el de la piel. Al término de 8 días los hámsters se pesaron, se

anestesiaron con cloroformo, se abrieron para extraer el hígado y observar si había formación de abscesos.

4.- Eventos morfológicos en la fagocitosis de E. histolytica.

Los eritrocitos de humano se resuspendieron a 1×10^8 eritrocitos/ml en medio TY1-S-33. Para lo anterior se efectuó una dilución de eritrocitos con medio TY1-S-33, se contaron en el hematímetro, y se ajustaron a 1×10^8 eritrocitos/ml en TY1-S-33. Por otra parte, los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento de las clonas A y L-6 se ajustaron a 1×10^6 amibas/ml en TY1-S-33.

Tubos duplicados y marcados previamente se incubaron en un baño de agua-hielo. A cada tubo se agregaron 0.4 ml de una suspensión de trofozoítos (1×10^6 /ml) de las clonas A ó L-6, posteriormente se agregaron 0.4 ml de eritrocitos humanos (1×10^8 /ml).

A los 5 min de incubación a 0°C la mitad de los tubos se pasaron a un baño de agua a 37°C para permitir la distribución de los eritrocitos adheridos en la superficie de la amiba y la ingestión de los mismos. A los tiempos 1, 2, 3, 4 y 5 min de incubación a 37°C a cada uno de los tubos se les agregaron 0.5 ml de glutaraldehído al 2.5% en solución amortiguadora de fostatos (PBS) para detener el proceso de fagocitosis. La otra mitad de los tubos incubados durante 5 min a 0°C se incubó a temperatura ambiente durante 3, 5 y 7 min. En este caso la reacción se detuvo también agregando a los tiempos preestablecidos 0.5 ml de glutaraldehído (2.5% en PBS) a cada tubo y se incubaron a 37°C en un baño de agua durante 30 min. Posteriormente las amibas se lavaron 3 veces con PBS por centrifugación a $360 \times g$ durante 2 min. Los eritrocitos se con

trastaron con la tinción de Novikoff (Novikoff y col. 1972) durante 30 min a 37°C. Las preparaciones celulares se lavaron tres veces con PBS por centrifugación a 360 x g durante 2 min, para eliminar los eritrocitos del medio, y se examinaron 65 amibas al azar en un microscopio óptico Zeiss, para determinar los eritrocitos adheridos, ingeridos o formando casquete sobre la superficie amibiana para cada tiempo y cepa. En otros casos, previo a los ensayos de adhesión, fagocitosis y formación de casquete, los trofozoítos se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en una solución de citocalasina B (10 µg/ml en PBS).

5.- Adhesión de eritrocitos a trofozoítos de E. histolytica.

Los eritrocitos obtenidos de cada una de las especies mencionadas anteriormente se resuspendieron a 1×10^8 eritrocitos/ml en medio TY1-S-33. Por otra parte, los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento de las clonas A y L-6 se ajustaron a 1×10^6 - amibas/ml en TY1-S-33.

Los ensayos de adhesión se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Orozco, (1981). Tubos de centrifuga previamente rotulados, se colocaron en un baño de agua-hielo. A cada tubo se agregaron 0.4 ml de eritrocitos (1×10^8 /ml) y 0.4 ml de amibas (1×10^6 /ml) y se incubaron durante 5 a 10 min para permitir la interacción. A los 5 y 10 min las mezclas celulares se fijaron con glutaraldehído (2.5% en PBS). Las preparaciones se contrastaron con la tinción de Novikoff (Novikoff y col. 1972). De la pastilla se hicieron preparaciones en portaobjetos para contar los eritrocitos en 100 amibas elegidas al azar. Se obtuvieron promedios

de eritrocitos por amiba para cada tiempo y cepa.

6.-Fagocitosis de eritrocitos por trofozoítos de E.histolytica

Los ensayos de eritrofagocitosis se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Trissl y col.(1978). 0.4 ml de amibas - (1 x 10⁶/ml) se mezclaron con 0.4 ml de eritrocitos (1 x 10⁸/ml) y se incubaron en un baño de agua a 37°C por 5 y 10 min. Al finalizar estos tiempos se agregó a cada tubo 10 ml de agua bidestilada durante 5 min a temperatura ambiente para lisar los eritrocitos libres y adheridos a la membrana de las amibas. Los tubos se centrifugaron a 360 x g por 2 min y se descartaron los sobrenadantes. Las pastillas se fijaron con glutaraldehído (2.5% en PBS) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, las amibas se lavaron tres veces con PBS, por centrifugación a 360 x g durante 2 min. Los eritrocitos - se contrastaron con la tinción de Novikoff (Novikoff y col. 1972) durante 30 min a 37°C. Las preparaciones se lavaron nuevamente 3 veces con PBS por centrifugación a 360 x g durante 2 min. De la - pastilla se hicieron preparaciones en portaobjetos, se contaron - los eritrocitos ingeridos en 100 amibas elegidas al azar y se obtuvieron promedios para cada tiempo y cepa.

7.- Ensayos de hemaglutinación.

Preparación de eritrocitos. Los eritrocitos de diferentes especies se lavaron tres veces con solución de Alsever por centrifugación a 1,000 x g durante 10 min y se fijaron con glutaraldehído - (2.5% en PBS) durante una hora a 37°C. Se centrifugaron a 1,000 x g por 10 min, se lavaron una vez con glicina 0.1 M y 3 veces más con

NaCl al 0.9% (S S). Los eritrocitos se diluyeron al 10% con S S.

Determinación de la actividad de lectina por el método de hemaglutinación. Los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento de las clonas A y L-6 se incubaron en agua-hielo durante 10 min, se centrifugaron a $360 \times g$ por 10 min, se lavaron una vez con PBS y una vez con S S; las soluciones se utilizaron a $4^{\circ}C$. Las amibas se contaron en un hematímetro y se ajustaron a 1×10^6 amibas/ml de PBS al que se agregó fluoruro de fenilmetil sulfonil (PMSF) (Sigma) 25 mM. Las amibas se rompieron por congelación en acetona-hielo seco y descongelación en baño de agua a $37^{\circ}C$. Se pasaron inmediatamente a un baño de agua-hielo ($0^{\circ}C$) y se centrifugaron durante 5 min a $1,000 \times g$. Después de eliminar el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 1 ml de PBS con PMSF 25 mM. Los tubos se colocaron en un baño de agua-hielo y por medio de un homogenizador de teflón se homogenizó cada una de las muestras. Una gradilla con tubos de ensaye previamente rotulados en orden ascendente para cada dilución, se colocó en una palangana con hielo. A cada tubo de ensaye se agregaron 300 μl de PBS pH 5.7 y al primer tubo se le pusieron 300 μl de la muestra homogeneizada para tener una dilución 1:2; a partir de esta se efectuaron diluciones 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128.

Los ensayos se efectuaron por duplicado en placas de hemaglutinación de acuerdo a la técnica descrita por Kobiler y Mirelman (1980). En cada pozo se pusieron 25 μl de cada una de las diluciones y se le agregaron, 20 μl de albúmina sérica de bovino (BSA) (Sigma) al 1% recién preparada, 20 μl de PBS pH 5.7 y finalmente 20 μl de eritrocitos preparados al 2%. Al control negativo se le -

agregaron 25 μ l de PBS ph 7.0, 20 μ l de BSA al 1% y 20 μ l de eritrocitos. Las placas se agitaron suavemente por los cuatro costados y se incubaron a temperatura ambiente por una hora. Después de este tiempo se efectuó la lectura y se determinaron los títulos de hemaglutinación como la inversa de la dilución más alta que produjo hemaglutinación.

8.- Cultivos de levaduras Kluyveromices lactis.

Levaduras Kluyveromices lactis cepa silvestre y su mutante deficiente en N-acetilglucosamina (NAG) en la pared celular, obtenidas por Douglas y Ballou (1980), se cultivaron en matraces erlenmeyer con 50 ml de medio para levaduras YM-1. Con un asa estéril se tomó una muestra de levaduras de la cepa silvestre o de la cepa mutante cultivadas previamente en medio semisólido. El inoculo se paso a un matraz depositando la muestra sobre las paredes. Los matraces se incubaron a 37°C sobre un disco giratorio por 20 horas para la cepa silvestre y por 42 horas para la cepa mutante.

Las levaduras de la cepa silvestre o de la mutante se resuspendieron a 1×10^8 levaduras/ml en PBS; para lo anterior se efectuó una dilución de levaduras en PBS y se contó el número de células en el hematómetro. Las levaduras se lavaron 3 veces con PBS por centrifugación a 1,000 x g durante 7 min, posteriormente, se tiñeron con colorante de safranina durante 20 min a 37°C y se lavaron 3 veces con PBS.

En algunos casos las levaduras se fijaron con glutaraldehído (2.5% en PBS) durante 30 min a 37°C, se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con el colorante de safranina como se especificó ante

riormente.

- 9.- Fagocitosis y adhesión por E. histolytica de levaduras. Kluyveromices lactis de la cepa silvestre y su mutante deficiente en NAG.

Levaduras Kluyveromices lactis cepa silvestre y su mutante de deficiente en NAG en la pared celular (fijadas con glutaraldehído y sin fijar) se resuspendieron a 1×10^8 /ml en PBS. En tubos de centrífuga marcados con los tiempos diferentes para cada tiempo y cepa se agregaron 0.4 ml de la suspensión de levaduras y 0.4 ml de la suspensión de trofozoítos (1×10^6 /ml en TY1-S-33). Los tubos se incubaron a 37°C en un baño de agua ó a 0°C en agua-hielo durante 30, 60 y 120 min. A los tiempos indicados, las mezclas celulares se fijaron con glutaraldehído (2.5% en PBS) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, las preparaciones se lavaron 3 veces con PBS por centrifugación a $360 \times g$ durante 3 min. De la pastilla, se hicieron preparaciones en portaobjetos y se contaron en un microscopio Zeiss las levaduras ingeridas o adheridas en 100 amibas y se obtuvieron promedios de levaduras para cada tiempo y cepa.

- 10.- Fagocitosis de esferas de látex por trofozoítos de E. histolytica.

Esferas de látex coloreadas (Sigma) de 7 μm de diámetro se lavaron 3 veces con S S y se resuspendieron a 1×10^8 /ml en TY1-S-33. Se marcaron tubos cónicos con los tiempos diferentes para cada cepa, a cada tubo se agregaron 0.4 ml de la suspensión de esferas, y se incubaron a 37°C. Posteriormente, se agregaron 0.4 ml -

de la suspensión de trofozoítos ajustados a 1×10^6 /ml en TY1-S-33 y se incubaron a 37°C en un baño de agua durante 30, 60 y 90 min. Al término de estos tiempos las células se fijaron con glutaraldehído (2.5% en PBS) durante 30 min a 37°C. Posteriormente las preparaciones se lavaron 3 veces con S S por centrifugación a 360 x g por 3 min. Las esferas de látex ingeridas en 100 amibas al azar se contaron con la ayuda de un microscopio Zeiss a un aumento de 160 X y se obtuvieron promedios de esferas ingeridas por trofozoítos para cada tiempo y cepa.

RESULTADOS

1.- Virulencia de las Clonas A y L-6 de E. histolytica.

Uno de los objetivos de este trabajo fue estudiar en forma comparativa los pasos de la fagocitosis en las clonas A y L-6, aisladas a partir de la cepa HM1:IMSS y con un grado diferente de virulencia y fagocitosis (Orozco, 1981). Ha sido descrito que la virulencia de la clona A y de la cepa silvestre HM1:IMSS medida por inoculación intrahepática de trofozoítos en hámsters recién nacidos son semejantes. Por otra parte, se ha reportado que la clona L-6 no produce abscesos hepáticos, en hámsters recién nacidos cuando se inocula un número trofozoítos 5 veces mayor al que se requiere para producir abscesos con la cepa HM1:IMSS, en el 96% de los animales. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha determinado cuantitativamente la virulencia de estas clonas ni de otras cepas amebianas con datos estadísticos del tipo de la dosis absceso medio (DA_{50}) o la dosis letal media (DL_{50}). Estos datos permitirían hacer comparaciones más objetivas entre la virulencia de las cepas y las propiedades de los trofozoítos en relación con la virulencia. Por lo tanto, en este trabajo se realizaron estudios cuantitativos sobre la virulencia de las clonas A y L-6 inoculando hámsters de aproximadamente 100 gr de peso con diferente número de trofozoítos y establecer así el número necesario para producir abscesos hepáticos en el 50% de los animales inoculados.

A este número se le llamó dosis absceso medio (DA_{50}). Como se muestra en la Tabla I con 2.5×10^5 trofozoítos de la clona A se produjeron abscesos en el 90% de los hámsters inoculados. La -

DA₅₀ para esta clona resultó ser de 1.75×10^5 . Sin embargo con 3×10^6 trofozoítos no fue posible obtener la DA₅₀ para la clona L-6. Por otra parte, cuando se obtuvieron abscesos con la clona A éstos fueron generalizados y ocuparon más de las tres cuartas partes del hígado. Con la clona L-6, en cambio, los abscesos, cuando se llegaron a obtener, fueron generalmente pequeños.

2.- Eventos morfológicos en la fagocitosis de E. histolytica.

El estudio ultraestructural (Orozco, 1978) y cinemicrográfico (Cervantes) del efecto citopático de trofozoítos de E. histolytica sobre células en cultivo, tanto de hepatocitos de rata adulta en cultivo primario, como de cultivos de células epiteliales de la línea MDCK sugirió que el mecanismo de agresión de la amiba requiere como primera etapa la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco y que la fagocitosis es una fase posterior en el mecanismo de agresión de la amiba.

Con el objeto de determinar los pasos de la eritrofagocitosis por E. histolytica a nivel morfológico, se diseñó un método sencillo que permitió observar las diferentes etapas de la fagocitosis de eritrocitos humanos por E. histolytica. Los eritrocitos humanos se añadieron a trofozoítos de las clonas A ó L-6 incubados previamente a 0°C. Una vez que los eritrocitos se adhirieron a la superficie de los trofozoítos (5 min, 0°C) los tubos se incubaron, bien, a 37°C durante 1, 2, 3, 4 y 5 min, o bien, a temperatura ambiente durante 3, 5 y 7 min para permitir la distribución de los eritrocitos en la superficie de la amiba y su ingestión.

En las Figuras 1 a 8 se muestra la secuencia del evento de fagocitosis de eritrocitos humanos. La adhesión (Fig. 1 y 2) se midió a 0°C, la formación de casquete a temperatura ambiente (Fig 3 y 4) y a 37°C (Fig 5 y 6) y la ingestión a 37°C (Fig 7 y 8). Los resultados obtenidos del porcentaje de trofozoítos que mostraron - (cuando menos un eritrocito en la superficie) eritrocitos adheridos, ingeridos o formando casquete (más de cuatro eritrocitos aglutinados en un punto sobre la superficie amibiana) para cada temperatura tiempo y cepa se presentan en la Tabla II. La mayoría de los trofozoítos presentaron al mismo tiempo eritrocitos adheridos, formando casquete y otros ingeridos. Como se dijo anteriormente, en estos experimentos se muestra que tanto la clona A como la clona L-6 presentan semejante eficiencia de adhesión. El número de los casquetes formados por los eritrocitos en la superficie de las amibas a 37°C disminuye en los trofozoítos de la clona A a medida que aumenta el tiempo (de 2 a 5 min) como consecuencia de la ingestión - de los eritrocitos por los trofozoítos, mientras que en los trofozoítos de la clona L-6 se presenta un incremento en el número de casquetes debido probablemente a que la fagocitosis es mínima. Los eventos de adhesión, formación de casquete y fagocitosis, estudiados en las clonas A y L-6 con eritrocitos de humano muestran que - la deficiencia en la velocidad de fagocitosis de la clona L-6 se presenta tanto en la formación de casquete de los eritrocitos sobre la superficie amibiana, como en la velocidad de introducción de los eritrocitos al citoplasma.

La adhesión es una propiedad importante y posiblemente indispensable para la producción del daño a la célula huésped por los -

trofozoítos. Ya que no se aprecia una relación directa de esta propiedad con la virulencia de las cepas, se puede considerar que los factores que determinan las diferencias en la virulencia de las cepas amibianas probablemente se expresan en un paso ulterior a la adhesión del trofozoíto a la célula blanco, es decir en la fase de fagocitosis (Orozco y col., 1980).

3.- Efecto de la citocalasina B en la fagocitosis de eritrocitos por trofozoítos de la Clona A.

Trofozoítos de la clona A fueron incubados durante 10 min en solución de citocalasina B (10 µg/ml en PBS) a temperatura ambiente previo a los ensayos de fagocitosis, adhesión y formación de casquete. Como se muestra en las Tablas III y IV la citocalasina B actuó como inhibidor de la eritrofagocitosis, ya que se presentó una disminución en el número de eritrocitos ingeridos por amiba a 37°C. En presencia de la citocalasina B el porcentaje de inhibición de la fagocitosis a 37°C fué de 57%. En la cinética de adhesión y de formación de casquete a 22°C no se observaron diferencias significativas cuando los experimentos se realizaron con y sin citocalasina B.

Otro de los objetivos de este trabajo fue el de estudiar más ampliamente la especificidad de la fagocitosis en las clonas amibianas A y L-6 para lo cual se eligieron glóbulos rojos de diferentes especies, levaduras Kluyveromyces lactis cepa silvestre y su mutante deficiente en WAG en la pared celular y esferas de látex.

4.- Fagocitosis y adhesión de eritrocitos por trofozoítos de las Clonas A y L-6 de Entamoeba histolytica.

Para los ensayos de adhesión, trofozoítos de las clonas A y L-6 se pusieron en contacto con eritrocitos de humano, hámster, conejo, cuyo y rata en una relación de 1:100 y se incubaron a 0°C, temperatura a la cual la adhesión se realiza eficientemente pero no hay ingestión de eritrocitos (Orozco, 1981).

Como se muestra en las Figuras 9, 10, 11, 12 y 13 la adhesión de eritrocitos frescos a trofozoítos es diferente para cada especie, resultando los valores más altos de adhesión para los eritrocitos de humano, (Fig 9) siguiéndoles en afinidad los de hámster, (Fig 10) después los de conejo (Fig 11) y se obtuvieron valores de adhesión más bajos para eritrocitos de cuyo (Fig 12) y de rata (Fig 13). En la mayoría de los casos los valores de adhesión de eritrocitos a trofozoítos fueron semejantes para la clona A y para la clona L-6 en las diferentes especies estudiadas Figuras 9, 10, 11, 12, 13 y Tabla (V). Estos resultados presentan mayores evidencias de que la deficiencia en fagocitosis mostrada por la clona L-6 no radica en la adhesión.

Con el objeto de corroborar si la velocidad de fagocitosis se presentaba en relación directa con la virulencia de la cepa y con la eficiencia de adhesión del trofozoíto a eritrocitos de diferentes especies, los trofozoítos de las clonas A y L-6 se incubaron a 37°C con eritrocitos frescos de cada una de las especies mencionadas. A los tiempos 5 y 10 min se detuvo la reacción por medio de un choque hipotónico con agua bidestilada. Posteriormente las preparaciones se fijaron y se contrastaron con diaminobencidina (No-

vikoff y col. 1972) como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Como se muestra en las Figuras 9, 10, 11, 12, 13 y Tabla (V) la clona A presenta valores de eritrofagocitosis más altos para cada una de las especies, en comparación con la clona L-6.

Los experimentos anteriores con eritrocitos de diferentes especies mostraron que los trofozoítos de E. histolytica (clona A y L-6) presentan una afinidad selectiva de adhesión y fagocitosis en las diferentes especies estudiadas. La mayor eficiencia de fagocitosis fue mostrada por las dos clonas cuando éstas estuvieron en contacto con eritrocitos humanos. Los trofozoítos de ambas clonas mostraron una velocidad de eritrofagocitosis intermedia cuando se incubaron con eritrocitos de hámster, y de conejo y ésta fué más baja cuando se pusieron en contacto con eritrocitos de rata y de cuyo.

Estos resultados correlacionan directamente con la eficiencia de adhesión mostrada por los trofozoítos en contacto con eritrocitos de las diferentes especies.

Para descartar la posibilidad de que el tamaño de los eritrocitos fuera el que determinara la mayor o menor afinidad mostrada por los trofozoítos de ambas clonas en los ensayos de adhesión y fagocitosis, se midió el diámetro de los eritrocitos de cada una de las especies estudiadas Tabla (VI). Estos datos sugieren que existe una relación directa entre la eficiencia de eritrofagocitosis y la virulencia de las clonas estudiadas y una afinidad selectiva por eritrocitos de diferentes especies.

5.- Actividad hemaglutinante de los trofozoítos de las Clonas A y L-6.

Se ha descrito que en el proceso de adhesión de eritrocitos a trofozoítos es posible que participen lectinas de la superficie amibiana (Kobiler y Mirelman, 1980) y estas lectinas pueden ser detectadas por ensayos de hemaglutinación. En este trabajo se efectuaron ensayos de hemaglutinación con eritrocitos de diferentes especies. Se determinó la actividad aglutinante de los extractos amibianos totales sobre eritrocitos humanos, de hámster, de conejo de rata y de cuyo fijados con glutaraldehído (2.5% en PBS). El título de aglutinación se midió como la inversa de la dilución más alta que presentó hemaglutinación. En la tabla VII se muestra la actividad hemaglutinante de los extractos amibianos para cada especie de eritrocitos. En ella se observa que los extractos amibianos aglutinaron a los eritrocitos de todas las especies probadas. Sin embargo el título de aglutinación más alto se presentó con eritrocitos de hámster, en tanto que la actividad de hemaglutinación fue menor con eritrocitos de rata. La actividad de lectina de los extractos amibianos fue semejante en ambas clonas A y L-6.

6.- Fagocitosis y adhesión de levaduras Kluyveromices lactis de la cepa silvestre y de su mutante deficiente en NAG por trofozoítos de las Clonas A y L-6.

Kobiler y Mirelman (1980) reportaron que los trofozoítos de E.histolytica presentan una lectina asociada a la membrana celular con especificidad por polímeros de NAG. Con el propósito de estudiar el papel de la lectina amibiana descrita por Kobiler y Mirel

man (1980) y la participación de los receptores de NAG en el proceso de fagocitosis, se utilizaron levaduras de la cepa silvestre - Kluyveromyces lactis y de su mutante deficiente en NAG en la pared celular obtenidas por Douglas y Ballou (1980). Trofozoítos de las clonas A ó L-6 se incubaron a 0°C ó a 37°C con levaduras de la cepa silvestre o de su mutante sin fijar y fijadas con glutaraldehído (2.5% en PBS) en una relación 1:100. Las levaduras de la cepa silvestre y su mutante no se adhirieron a la superficie celular de los trofozoítos. En la Fig 14 se observa que ambas clonas presentaron una mayor eficiencia de fagocitosis cuando se incubaron a 37°C con levaduras de la cepa silvestre. Sin embargo, la ingestión de células por trofozoíto aumento tres veces más cuando las levaduras se fijaron con glutaraldehído Fig 15, aunque en estas condiciones también se observó una mayor ingestión de levaduras de la cepa silvestre. En ambos casos los trofozoítos de la clona A presentaron mayor eficiencia de fagocitosis, en tanto que la clona L-6 resultó nuevamente menos eficiente.

7.- Fagocitosis de esferas de látex por trofozoítos de las Clonas A y L-6 de E. histolytica.

En los resultados anteriores se describió que tanto la clona A como la clona L-6 presentan en general semejante eficiencia de adhesión a los eritrocitos, por lo tanto, la deficiencia en fagocitosis de la clona L-6 aparentemente no radica en el primer paso de la fagocitosis, la adhesión, sino que posiblemente se localice en un paso posterior a este evento, es decir, en la introducción de las partículas al citoplasma. Lo anterior se ve apoyado por los

experimentos de fagocitosis efectuados con esferas de látex por trofozoítos de las clonas A y L-6. Trofozoítos de las clonas A ó L-6 se incubaron a 37°C con esferas de látex a diferentes tiempos. En las Figuras 16 y 17 se muestran los resultados obtenidos. La ingestión de partículas de látex por los trofozoítos de ambas clonas es proporcional al tiempo de interacción. Sin embargo, los trofozoítos de la clona A presentaron los valores más altos de fagocitosis de esferas de látex para cada tiempo; en comparación con la clona L-6.

Las esferas de látex no se adhirieron a la superficie de los trofozoítos, probablemente, por que no presentan grupos funcionales que puedan interactuar específicamente con componentes de la superficie celular del trofozoíto y solamente fuerzas físicas promueven la adhesión entre éstos y las esferas de látex para dar lugar a la fagocitosis. Sin embargo, estas fuerzas físicas aparentemente no son lo suficientemente grandes para que las esferas permanezcan unidas a la superficie de los trofozoítos, tendiendo éstas por su peso a caer.

TABLA I

VIRULENCIA DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS

(Clonas A y L-6)

Clona	Número de Trofozoítos	Núm. de hámsters inoculados	% de hámsters con absceso hepático.
HMI:FMSS	2 x 10 ⁵	20	96
A	2.5 x 10 ⁵	20	90
A	2.0 x 10 ⁵	10	80
* A	1.75x 10 ⁵	30	50
L-6	2.0 x 10 ⁵	10	0
L-6	1 x 10 ⁶	30	6.6
L-6	2 x 10 ⁶	30	20
L-6	3 x 10 ⁶	20	30

* DA₅₀. - El número mínimo de trofozoítos suficientes para producir abscesos hepáticos en el 50% de los hámsters inoculados.

FIGURAS 1 y 2

ADHESION DE ERITROCITOS DE HUMANO A LA SUPERFICIE
DE TROFOZOITOS DE E. HISTOLYTICA.

Trofozoitos de las clonas A ó L-6 se incubaron con eritrocitos a 0°C durante 5 min. La reacción se detuvo agregando glutaraldehído (2.5% en PBS). Las preparaciones se contrastaron con diaminobencidina y se observaron al microscopio para contar el porcentaje de amibas con eritrocitos adheridos.



FIGURAS 3 y 4

FORMACION DE CASQUETE DE ERITROCITOS HUMANOS EN
LA SUPERFICIE DE E. HISTOLYTICA.

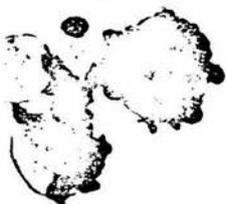
Trofozoítos de las clonas A 6 L-6 se incubaron con eritrocitos a 0°C durante 5 min. Posteriormente se pasaron a 22°C durante 5 min. Las preparaciones se fijaron con glutaraldehído (2.5% en PBS), se contrastaron con diaminobencidina y se observaron al microscopio para contar el porcentaje de amibas con eritrocitos formando casquete.



FIGURAS 5 y 6

FORMACION DE CASQUETE DE ERITROCITOS HUMANOS EN
LA SUPERFICIE DE E. HISTOLYTICA.

Trofozoítos de las clonas A ó L-6 se incubaron con eritrocitos a 0°C durante 5 min. Posteriormente los tu bos se pasaron a 37°C durante 1 a 5 min. Las prepara-- ciones se fijaron con glutaraldehído (2.5% en PBS), se contrastaron con diaminobencidina y se observaron al - microscopio para contar el porcentaje de amibas con eri trocitos formando casquete.



FIGURAS 7 y 8

TROFOZOITOS DE E. HISTOLYTICA CON ERITROCITOS
INGERIDOS.

Trofozoítos de las clonas A 6 L-6 se incubaron con eritrocitos a 0°C durante 5 min. Posteriormente los tu bos se pasaron a 37°C durante 1 a 5 min para permitir - la fagocitosis de los eritrocitos. La reacción se detu vo agregando glutaraldehído (2.5% en PBS), las prepara- ciones se contrastaron con diaminobencidina y se obser- varon al microscopio para contar el porcentaje de amibas con eritrocitos ingeridos.

En las fotos se observan además eritrocitos adher dos y algunos formando casquete.



TABLA II

EVENTOS MORFOLOGICOS EN LA ERITROFAGOCITOSIS DE E. HISTOLYTICA

(Clonas A y L-6)

T= 37°C	CLONA A			CLONA L-6		
	ERITROCITOS			ERITROCITOS		
t (min)	¹ D	² C	³ F	¹ D	² C	³ F
1	70	57.8	6	92	21	0
2	42	75	12	98	40	0
3	46.8	62.8	76	88.5	39	6
4	45	43	73	85	37	15
5	52.5	46.2	92	78	57.5	25.5

T= 22°C	CLONA A			CLONA L-6		
	ERITROCITOS			ERITROCITOS		
t (min)	D	C	F	D	C	F
3	100	4.6	0	98.4	3	0
5	69.7	37.5	0	100	6	0
7	53	76	0	98.4	19	0

- 1.- Eritrocitos distribuidos en la superficie de la amiba.
- 2.- Eritrocitos formando casquete.
- 3.- Eritrocitos fagocitados.

Después de 5 min de incubación a 0°C los trofozoítos se incubaron a 37°C ó a 22°C y a los tiempos descritos se midió el porcentaje de trofozoítos con eritrocitos distribuidos en la superficie (1), eritrocitos formando casquete, más de cuatro eritrocitos aglutinados sobre un punto de la superficie amibiana (2) y eritrocitos fagocitados, cuando menos un eritrocito por trofozoíto (3).

TABLA III

EFFECTO DE LA CITOCALASINA B SOBRE LA FAGOCITOSIS
DE E. HISTOLYTICA

(Clona A)

Citocalasina B	T°C	e/a
0	37	6.8
10 µg/ml	37	2.8

En los ensayos realizados a 37°C para medir la fagocitosis los eritrocitos adheridos a la superficie amibiana se lisaron por medio de un choque hipotónico con agua bidestilada. t= 5 min.

TABLA IV

EFFECTO DE LA CITOCALASINA B SOBRE LA ADHESION
Y FORMACION DE CASQUETE EN E. HISTOLYTICA.

(Clona A)

t (min)	Cit. B (μ g/ml)	Eritrocitos		
		D	C	F
3	0	89.7	14.7	0
3	10	95.5	13	0
5	0 [†]	86.7	33.8	0
5	10	88	30.8	0
7	0	67.6	63	0
7	10	69	61.7	0

T= 22°C

Los trofozoítos fueron incubados en Citocalasina B
10 μ g/ml durante 10 min previo a los experimentos
de interacción con eritrocitos.

FIGURAS 9, 10, 11, 12 y 13

ADHESION Y FAGOCITOSIS ENTRE TROFOZOITOS DE E. HIS-
TOLYTICA Y ERITROCITOS.

En los ensayos de adhesión, trofozoítos de E. his-
tolytica (Clona A ó L-6) se pusieron en contacto con -
eritrocitos a 0°C en una relación de 100 eritrocitos -
por amiba. Para los ensayos de eritrofagocitosis a los
5 y 10 mín de incubación a 37°C se agregó agua destila-
da para lisar los eritrocitos en suspensión y adheridos
a la superficie de los trofozoítos.

Las preparaciones se fijaron con glutaraldehído -
(2.5% en PBS), se contrastaron con diaminobencidina y
se contaron los eritrocitos ingeridos por 100 amibas.
Se obtuvieron los promedios de eritrocitos por amiba -
para cada tiempo y cepa. Las barras indican las desvia-
ciones standard.

FIGURA 9

ADHESION Y FAGOCITOSIS ENTRE TROFOZOITOS Y
ERITROCITOS DE HUMANO

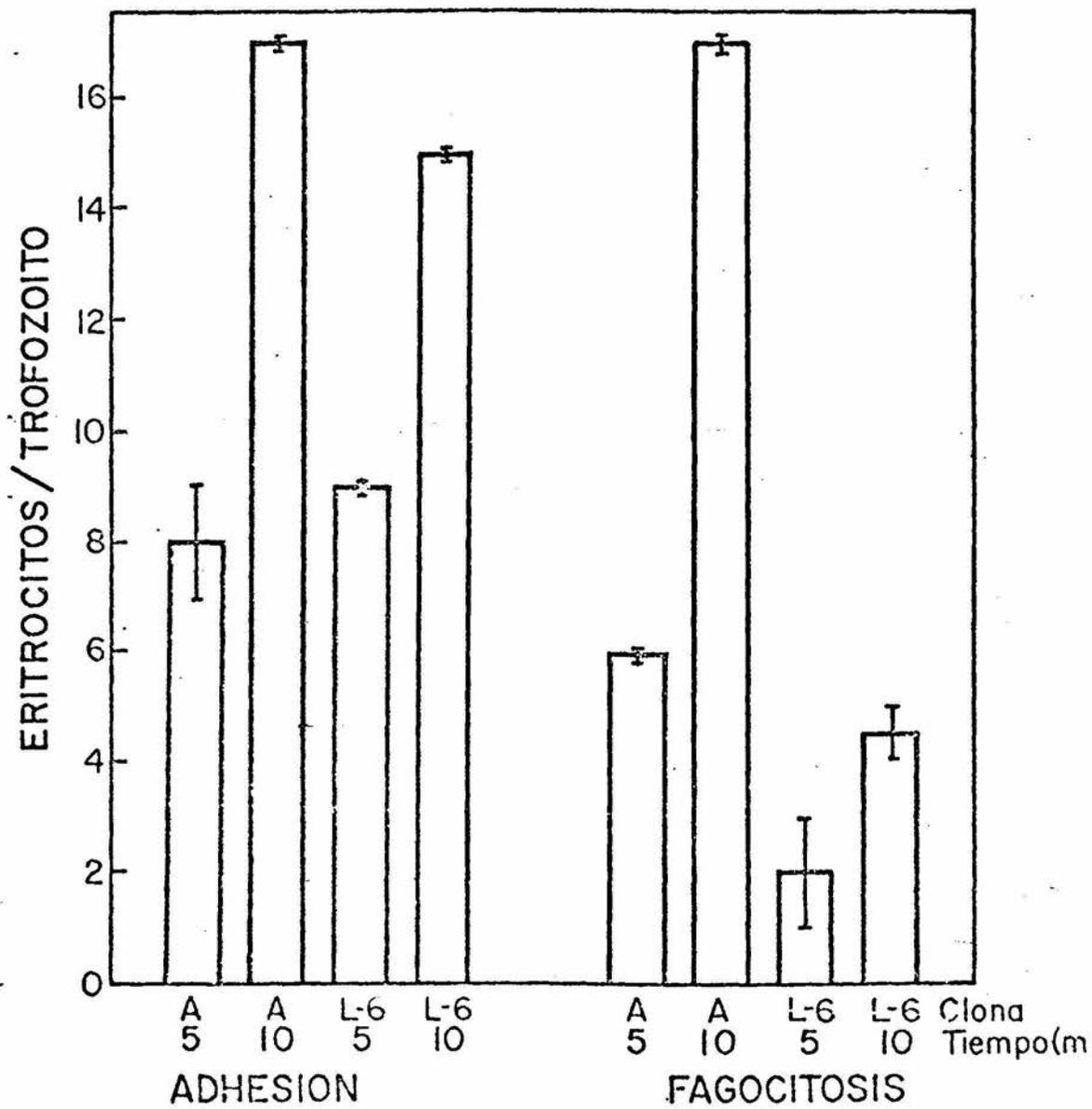


FIGURA 10

ADHESION Y FAGOCITOSIS ENTRE TROFOZOITOS Y
ERITROCITOS DE HAMSTER

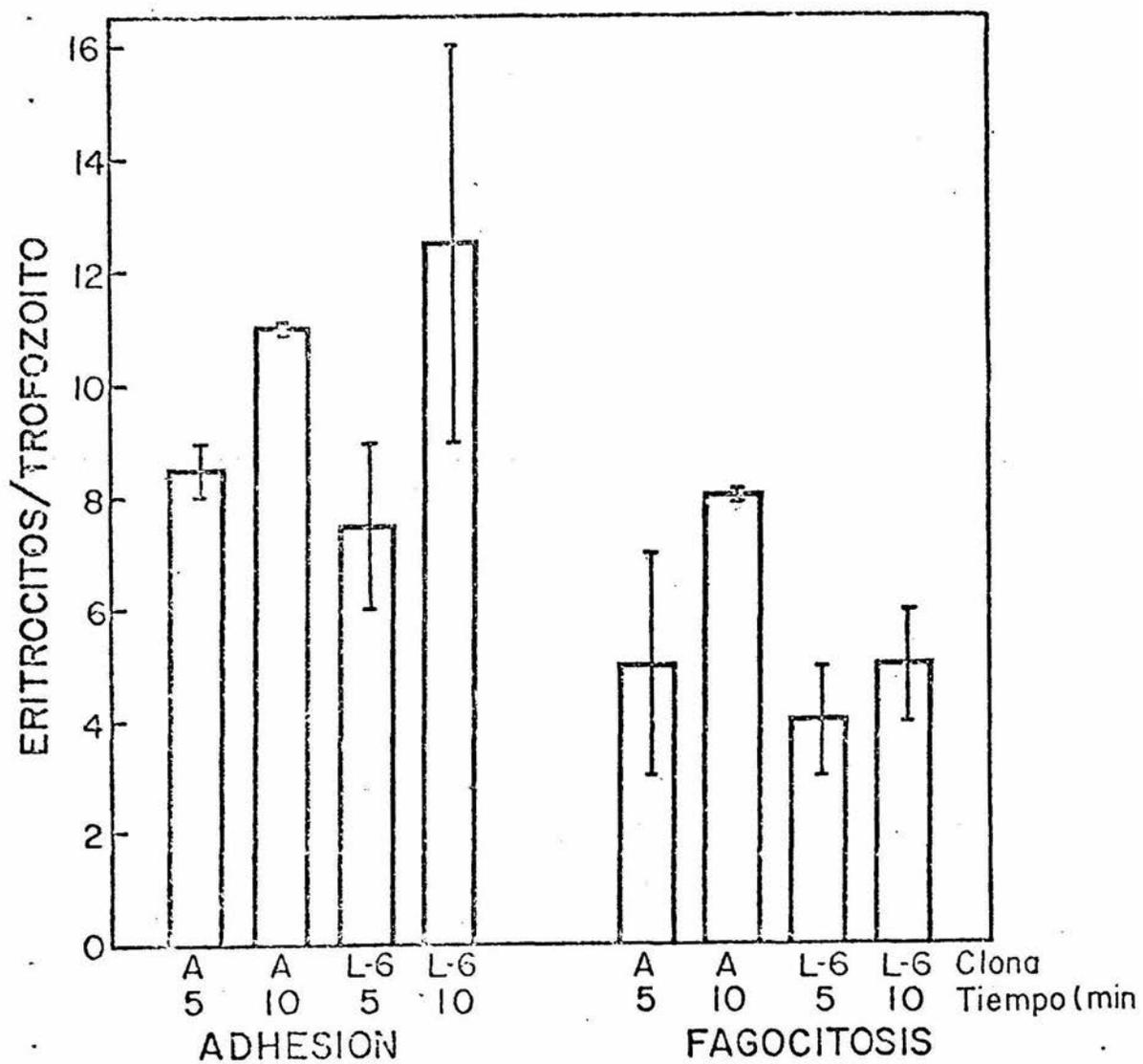


FIGURA 11

ADHESION Y FAGOCITOSIS ENTRE TROFOZOITOS Y
ERITROCITOS DE CONEJO

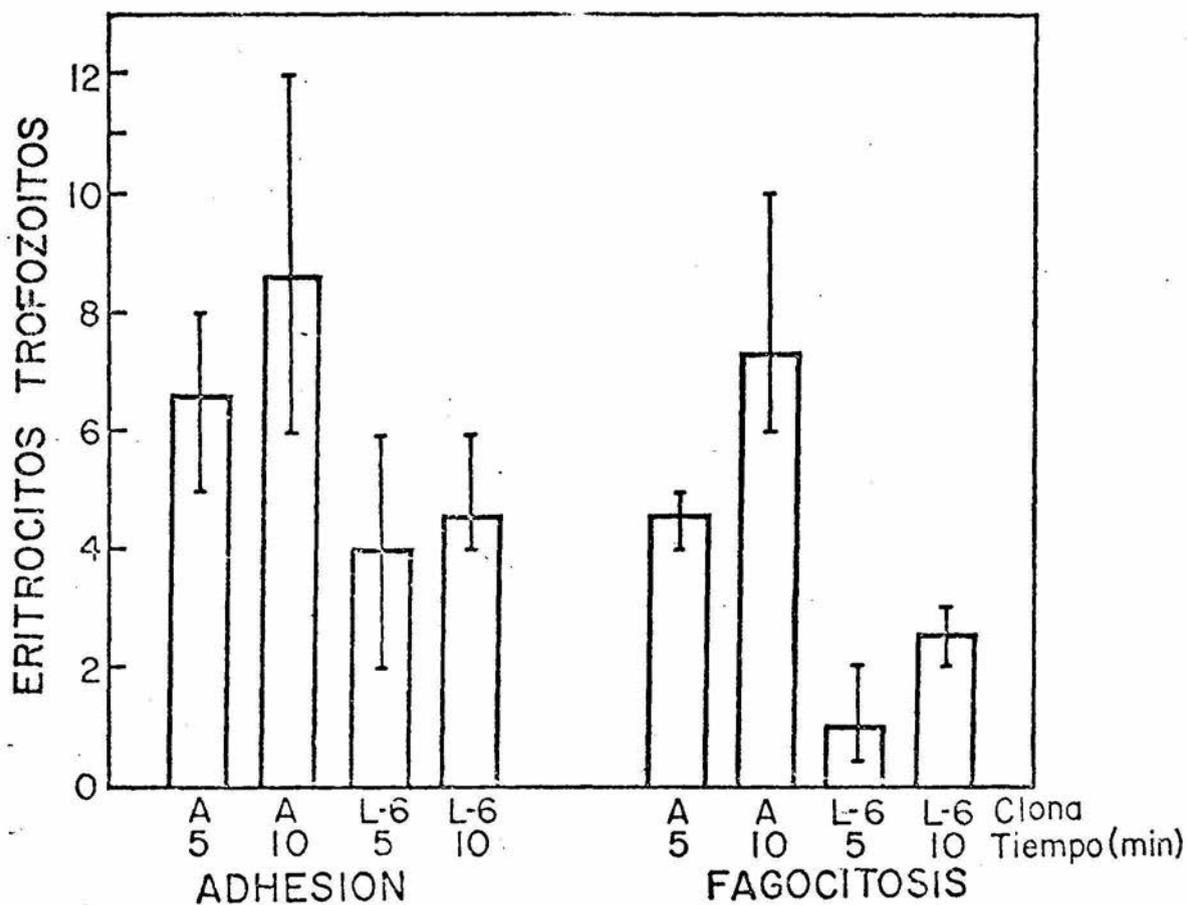


FIGURA 12

ADHESION Y FAGOCITOSIS ENTRE TROFOZOITOS Y
ERITROCITOS DE CUYO

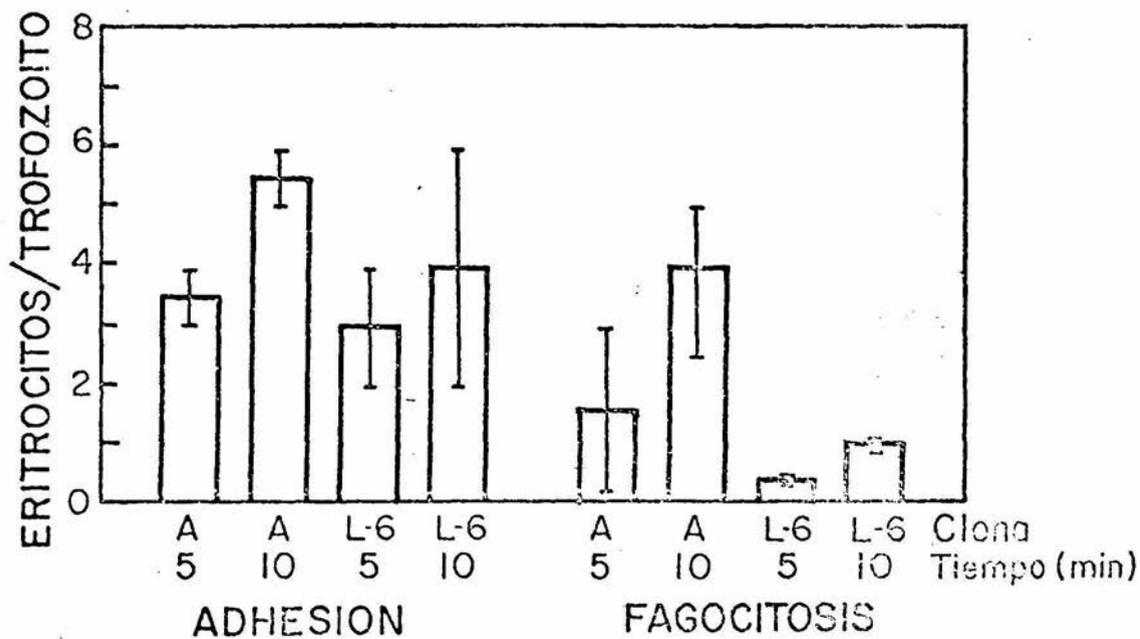
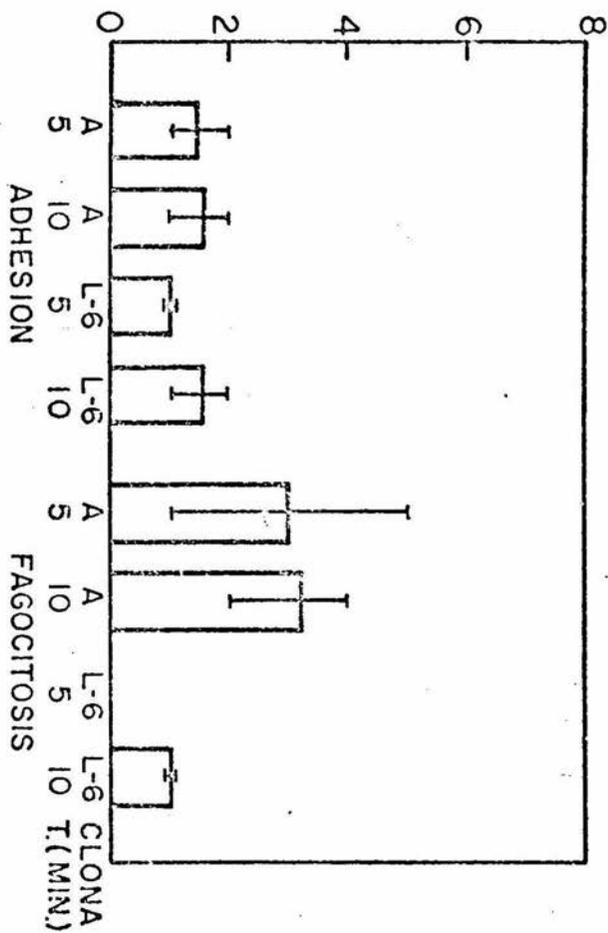


FIGURA 13

ADHESION Y FAGOCITOSIS ENTRE TROFOZOITOS Y
ERITROCITOS DE RATA

ERITROCITOS/TROFOZOITO



PRUEBA DE t "STUDENT"

CLONA	ADHESION				FAGOCITOSIS			
	A	L-6	A	L-6	A	L-6	A	L-6
TIEMPO (min)	5	5	10	10	5	5	10	10
Humano	1.5		0.5		6.06		6.57	
Hámster	0.15		0.29		0.79		2.6	
Conejo	2.0		3.4		2.13		3.25	
Cuyo	1.3		1.2		6.2		2.5	
Rata	1.42		0.96		3.37		3.75	

t "student" = 2.04

t > 2.04 Si hay diferencias (valores de adhesión ó fagocitosis diferentes en ambas clonas.)

t < 2.04 No hay diferencias (valores de adhesión ó fagocitosis semejantes en ambas clonas.)

TABLA VI

TAMAÑO DE ERITROCITOS DE DIFERENTE ESPECIE

Especie	diámetro (μm)
Hámster	6.3
Rata	7.2
Cuyo	7.1 a 7.5
Conejo	6.5 a 7.5
Humano	6.5 a 8.0

El diámetro de los eritrocitos fue medido con un ocular micrométrico y a un aumento de 40 x

TABLA VII

AGLUTINACION DE ERITROCITOS DE DIFERENTES ESPECIES
 POR EXTRACTOS DE E. HISTOLYTICA

Especie	* Actividad de lectina	
	Clona A	L-6
Rata	12	10
Humano	16	21
Cuyo	18	20
Conejo	34	29
Hámster	128	128

* Actividad de lectina: Se midió como la inversa de la dilución más alta de extractos amibianos que produjo hemaglutinación.

FIGURA 14

FAGOCITOSIS DE LEVADURAS KLUYVEROMICES LACTIS POR
E. HISTOLYTICA (CLONAS A y L-6)

Trofozoítos de E. histolytica (Clona A ó L-6 se incubaron a 37°C con levaduras de la cepa silvestre Kluyveromices lactis o su mutante deficiente en NAG en la pared celular fijadas con glutaraldehído (2.5% en PBS) o sin fijar en una relación de 100 levaduras por amibas. A diferentes tiempos las preparaciones se fijaron con glutaraldehído, se lavaron con PBS y se contaron las levaduras ingeridas por 100 amibas. Se obtuvieron promedios de levaduras por amiba para cada tiempo y cepa. Δ: Clona A ; O : Clona L-6.

Δ , O fagocitosis de levaduras Kluyveromices lactis cepa silvestre.

Δ , ● fagocitosis de levaduras Kluyveromices lactis cepa mutante carente de NAG en la pared celular.

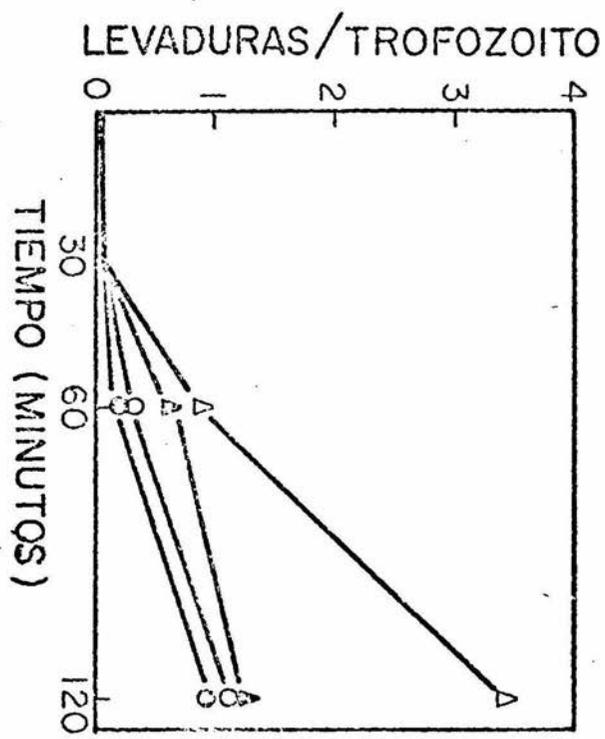


FIGURA 15

FAGOCITOSIS DE LEVADURAS KLUYVEROMICES LACTIS
POR E. HISTOLYTICA (CLONAS A y L-6).

Los experimentos se realizaron como se indico en la fig. 14.

Los índices de fagocitosis para cada clona se obtuvieron multiplicando el promedio de levaduras ingeridas por trofozoíto , por el porciento de trofozoítos que presentaron cuando menos una levadura ingerida.

- S levaduras Kluyveromices lactis cepa silvestre (fijadas con glutaraldehído 2.5%).

- M levaduras Kluyveromices lactis cepa mutante carente de NAG en la pared celular (fijadas con glutaraldehído 2.5%).

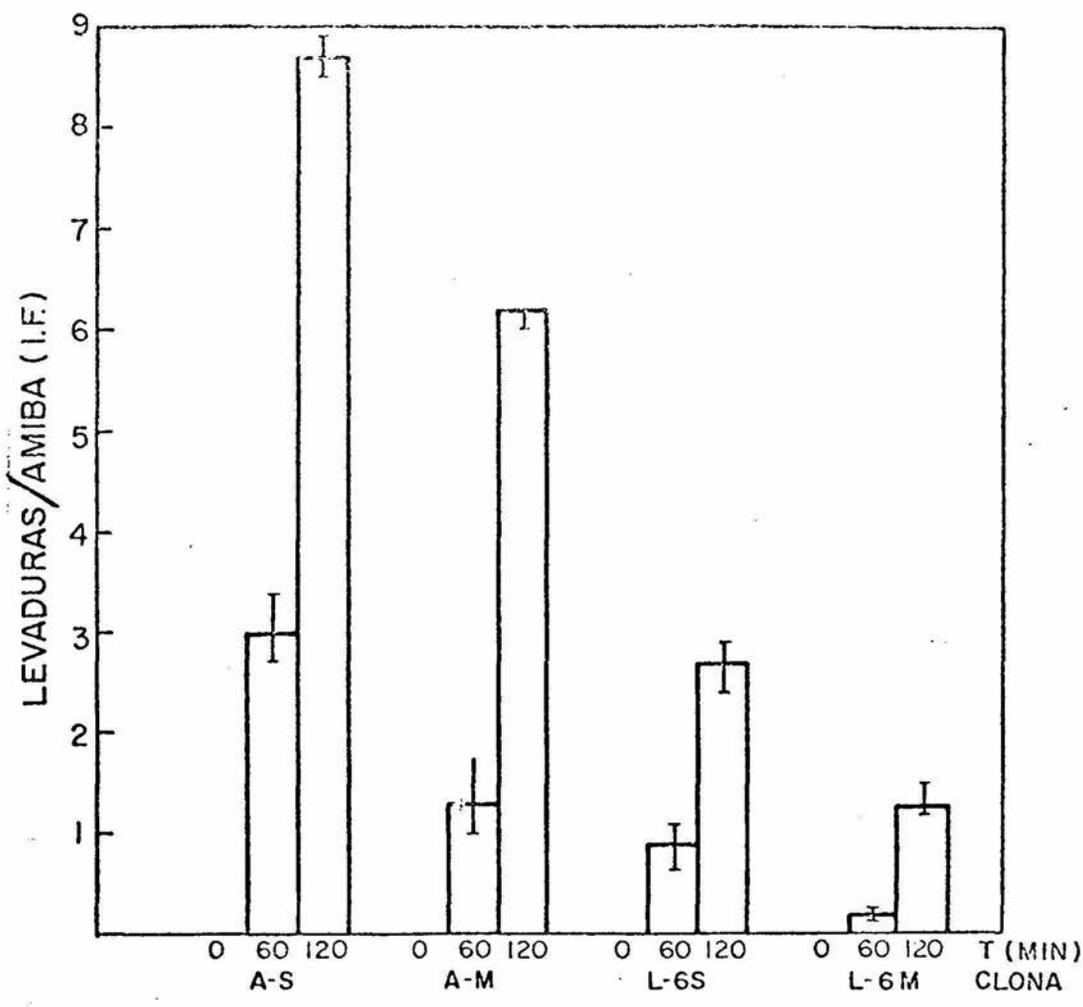


FIGURA 16

FAGOCITOSIS DE ESFERAS DE LATEX POR E. HISTOLYTICA

Trofozoítos de E. histolytica (Clona A ó L-6) se incubaron con esferas de látex a 37°C en una relación de 100 esferas por amiba. A diferentes tiempos las preparaciones se fijaron con glutaraldehído, se lavaron con solución salina y se contaron las esferas ingeridas por 100 amibas. Se obtuvieron los promedios de esferas por amiba y los porcentajes de las amibas que fagocitaron para cada tiempo y cepa. Δ; Clona A ; O ; Clona L-6.

(-----) porcentaje de amibas que fagocitaron cuando menos una esfera.

(_____) esferas/amiba.

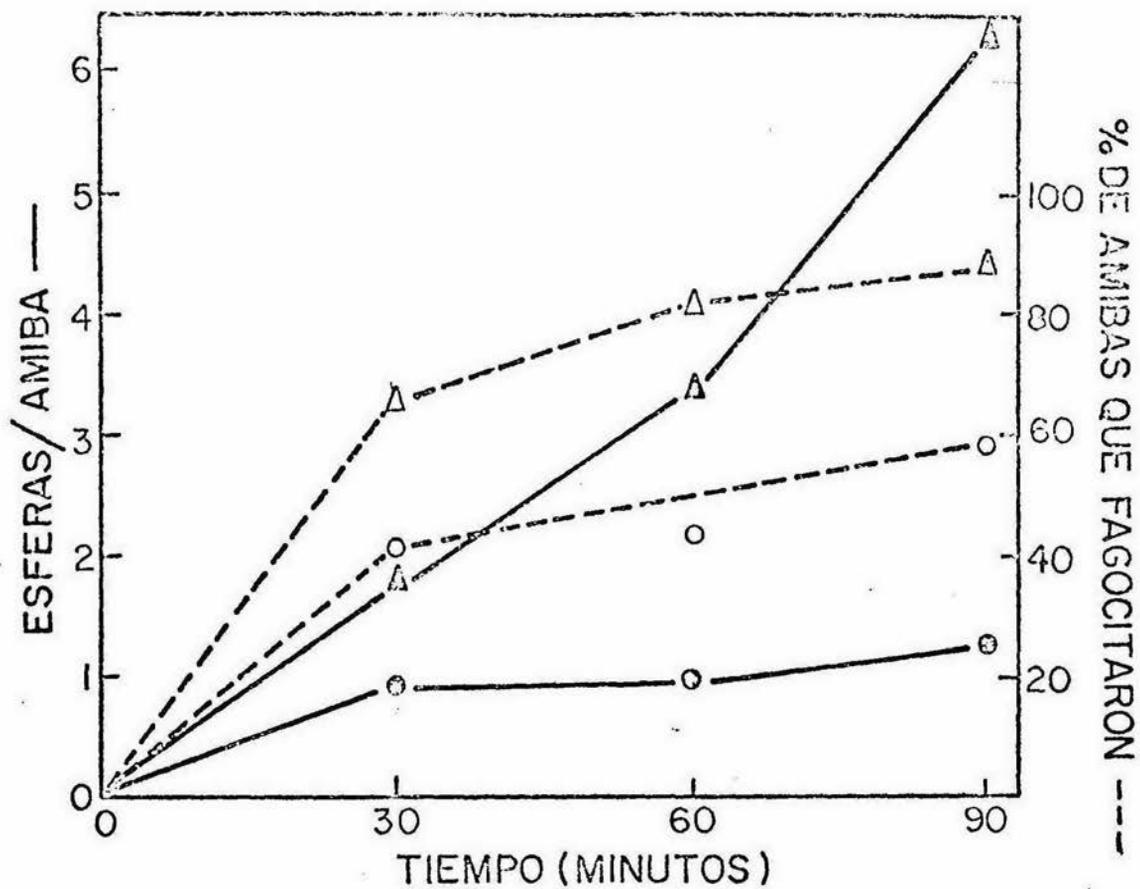
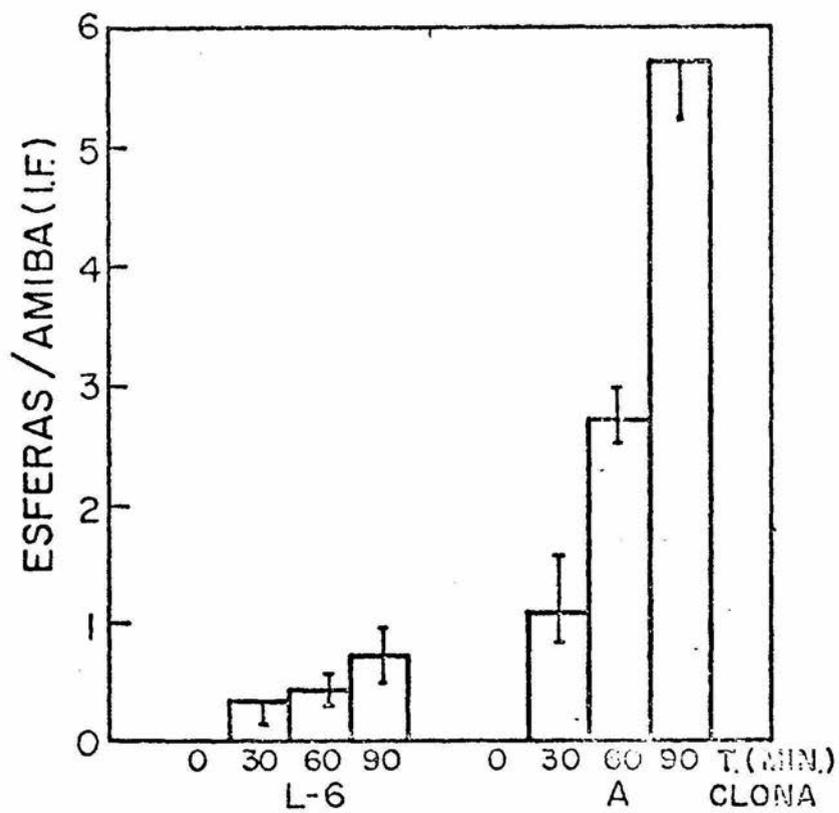


FIGURA 17

INDICES DE FAGOCITOSIS DE ESFERAS DE LATEX POR
E. HISTOLYTICA

Los experimentos se realizaron como se indico anteriormente en la fig. 14.

Los índices de fagocitosis para cada clona se obtuvieron multiplicando el promedio de esferas ingeridas por trofozoíto, por el porciento de trofozoítos que presentan cuando menos una esfera ingerida.



DISCUSION Y CONCLUSION

1.- Uso de Clonas en el estudio de la virulencia de E. histolytica.

La velocidad de fagocitosis es uno de los factores más importantes en la virulencia de las cepas amibianas (Trissl y col, 1978; Orozco y col. 1980). Para estudiar este evento, nosotros elegimos dos clonas de E. histolytica la clona A fue aislada directamente de HM1:IMSS y presenta virulencia y fagocitosis semejante a la de la cepa silvestre, mientras que la clona L-6 fue seleccionada por su deficiencia en fagocitosis y resultó ser deficiente en virulencia (Orozco, 1981). El estudio de los factores de virulencia de la amiba, se habían realizado hasta la fecha con cepas amibianas que no habían sido clonadas, (Trissl y col. 1977, 1978; Orozco y col.- 1980, Kobilier y Mirelman, 1980; Ravidin y Guerrant, 1981) el aislamiento a partir de la cepa HM1:IMSS de dos clonas con diferentes fenotipos de virulencia y fagocitosis pone de manifiesto que las cepas amibianas, aisladas directamente de pacientes y subcultivadas por largo tiempo en el laboratorio, son heterogéneas. El hecho de trabajar con cepas heterogéneas representa una limitación en la interpretación de los estudios a nivel molecular. Por otra parte, esta heterogeneidad podría explicar la variabilidad en cuanto a la virulencia y otras propiedades de superficie que presentan las cepas de E. histolytica (Bos, 1975; Lushbaugh y col. 1978 y nuestras observaciones no publicadas). Los resultados obtenidos utilizando clonas amibianas podrían ser de mayor confiabilidad y reproducibilidad que los obtenidos con cepas heterogéneas en las que eventual

mente algunas de las subpoblaciones pudiese predominar sobre el resto rompiendo el equilibrio lo que daría resultados diferentes, dependiendo de las características de la subpoblación predominante.

2.- Cuantificación de la Virulencia.

Otra de las limitaciones en el estudio de la virulencia de la amiba ha sido la falta de un sistema adecuado para medir cuantitativamente la virulencia de las cepas. En este trabajo, se establece la medición cuantitativa de la virulencia de las clonas A y L-6 por determinación de la DA_{50} , en forma semejante a la que se ha venido utilizando en bacterias desde hace varias décadas.

Se había reportado que las clonas A y L-6 presentan virulencia diferente medida por inoculación intrahepática de hámsters recién nacidos. En este trabajo se cuantificó esa diferencia y queda definido que la clona A es cuando menos 20 veces más virulenta que la clona L-6, ya que la DA_{50} fue de 1.75×10^5 mientras que no fue posible determinar con exactitud la DA_{50} de la clona L-6 ya que los animales mueren debido a la obstrucción venosa por los trofozoítos cuando se inoculan en dosis mayores a 3×10^6 .

3.- Eventos morfológicos en la fagocitosis de eritrocitos por E. histolytica.

La velocidad de fagocitosis de la clona A es mayor que la de la clona L-6 (Orozco, 1981) sin embargo la fagocitosis es un evento muy complejo que involucra varios pasos como, la adhesión, el posible movimiento de la partícula adherida a la superficie de la célula, hacia un punto determinado que podría ser el uroide (Chávez

y col. 1972), la formación de pseudópodos para englobar la partícula y la digestión intracelular de la misma. En la mayoría de estos eventos, participan tanto los receptores de superficie como los elementos del citoesqueleto.

Es posible suponer, que si cualquiera de los eventos mencionados anteriormente no se realiza eficientemente, la velocidad de fagocitosis se verá afectada. En base a estas consideraciones, se diseñó un método sencillo basado en la dependencia de la temperatura de algunos de los pasos señalados, para determinar cuál de estos pasos es el responsable de la baja eficiencia de fagocitosis presentado por la clona L-6. Los resultados obtenidos muestran que mientras la adhesión es igualmente eficiente en las clonas A y L-6, el movimiento de los eritrocitos en la superficie de la clona L-6 es más lento que en la clona A tanto a 37°C como a 22°C. La ventaja de realizar los experimentos de formación de casquete de los eritrocitos sobre la superficie de la amiba, a 22°C es que la ingestión no se realiza a esta temperatura, lo que nos permite separar los eventos y estudiarlos con mayor precisión.

El uso de las drogas del tipo de la Citocalasina B demostró que esta droga inhibe la ingestión de eritrocitos a 37°C pero cuando los trofozoítos se incubaron con Citocalasina B a 22°C el porcentaje de amibas con eritrocitos adheridos y formando casquete no disminuye. (Cano, 1981) reportó que la Citocalasina B inhibe la adhesión de eritrocitos a los trofozoítos. Estos resultados y los nuestros sugieren que si bien hay disminución en el número de eritrocitos adheridos en presencia de Citocalasina B, aquellos que se logran adherir presentan movimientos sobre la membrana de la amiba

para formar casquete semejante al que se observa en ausencia de Citocalasina B.

4.- Adhesión.

La adhesión específica a la célula blanco parece ser un prerequisito importante en el mecanismo de agresión de la amiba (Knight, 1977; Orozco, 1978). Sin embargo por los resultados discutidos anteriormente en los que la clona L-6 presentó una eficiencia de adhesión semejante a la de la clona A y por los resultados reportados por otros autores (Martínez-Palomo y col. 1980; Orozco y col. 1980) en los que cepas amibianas de diferente virulencia y fagocitosis presentan semejante eficiencia de adhesión a diferentes tipos de células blanco se puede concluir que si bien la adhesión es uno de los pasos, probablemente el primero de la fagocitosis y del mecanismo de agresión de la amiba, no es el que determina la velocidad de fagocitosis ni la virulencia de las cepas.

Para obtener mayor evidencia de que la adhesión específica es un prerequisito para que la fagocitosis se realice eficientemente se eligieron glóbulos rojos de diferentes especies de mamíferos para realizar estudios de adhesión y fagocitosis, suponiendo que los eritrocitos de diferentes especies, presentan diferentes receptores en su superficie, por los cuales la amiba puede tener mayor o menor afinidad.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que E. histolytica presenta diferente atracción por eritrocitos de diferentes especies. La adhesión a eritrocitos de diferentes especies fue más eficiente cuando se usaron eritrocitos de humano

y de hámster, intermedia cuando se utilizaron eritrocitos de conejo y baja cuando se utilizaron eritrocitos de cuyo y de rata. Las clonas A y L-6 presentaron en general semejante eficiencia de adhesión entre sí. La velocidad de fagocitosis de la clona A fue mayor que la de la clona L-6 en todos los casos probados, también fue dependiente de la especie y tanto para la clona A como para la clona L-6 fue más eficiente también cuando las amibas se incubaron con eritrocitos de humano y de hámster, intermedia con eritrocitos de conejo y baja cuando se utilizaron eritrocitos de cuyo y de rata, guardando una correlación estrecha con la eficiencia de adhesión. A partir de estos resultados se puede concluir que una adhesión eficiente es importante para una fagocitosis eficiente, sin embargo si una clona es deficiente en otro de los aspectos de la fagocitosis como el caso de la clona L-6, la ingestión de partículas se verá afectada por dicha deficiencia. Por otra parte, es probable que el tamaño de las partículas a fagocitar intervenga en la velocidad con que éstos se puedan ingerir, por lo tanto para descartar la posibilidad de que los resultados obtenidos se debiera más que a especificidad en adhesión al tamaño de los eritrocitos, se midió el tamaño de los eritrocitos de las diferentes especies usadas en este trabajo. El diámetro de los eritrocitos de las especies utilizadas no presentó diferencias significativas que pudieran explicar la diferente afinidad de la amiba por ellos.

5.- Hemaglutinación por extractos de E. histolytica.

La actividad aglutinante de los extractos amibianos sobre los eritrocitos de diferentes especies mostró a excepción de los eri-

trocititos humanos correlación directa con la eficiencia de adhesión. Estos resultados sugieren que algunos de los factores involucrados en la adhesión participan también en la hemaglutinación. Por otra parte las clonas A y L-6 mostraron entre sí semejante eficiencia de adhesión a los eritrocitos de cada una de las diferentes especies y también la actividad hemaglutinante de los extractos de las clonas A y L-6 fue semejante entre sí para las diferentes especies usadas, aunque varió de especie a especie como en el caso de la adhesión.

Estos resultados apoyan la hipótesis expuesta anteriormente sobre la existencia de factores semejantes involucrados en la aglutinación y en la adhesión. Un experimento importante sería utilizar azúcares diferentes para determinar si la amiba se une a los eritrocitos de diferentes especies por medio de receptores semejantes y si la diferente afinidad se debe al mayor o menor número de receptores expuestos en la superficie de los eritrocitos, o bien si los receptores en cada especie, son diferentes y la amiba presenta mayor afinidad por cierto tipo de receptores.

6.- Fagocitosis de levaduras Kluyveromices lactis cepa silvestre y de su mutante deficiente en NAG en la pared celular.

Anteriormente se discutió la existencia de factores semejantes involucrados en la aglutinación de eritrocitos y la adhesión - de los mismos por las clonas A y L-6 de E. histolytica. Con objeto de obtener más información acerca del papel de la lectina amibiana descrita por Kobilier y Mirelman (1980) en la adhesión y fagoci-

tosis se estudio la fagocitosis en levaduras Kluveromices lactis cepa silvestre y su mutante deficiente en NAG en la pared celular. Los resultados muestran que hubo una mayor eficiencia de fagocitosis por levaduras tipo silvestre en tanto que esta fue menor para las levaduras cepa mutante. Las diferencias se observan claramente en los índices de fagocitosis obtenidos con levaduras Kluyveromices lactis fijadas con glutaraldehído (2.5% en PBS). Estos experimentos son una prueba más de la importancia del papel de la lectina amibiana y su especificidad por receptores NAG.

7.- Fagocitosis de esferas de látex por E. histolytica.

El objeto de haber realizado estudios de fagocitosis con esferas de látex fue con el fin de corroborar si la deficiencia en fagocitosis de la clona L-6 se presenta en la introducción de las partículas al citoplasma. Los resultados muestran que en este caso también los trofozoítos de la clona A presentaron una mayor eficiencia de fagocitosis por esferas de látex en tanto que la ingestión de partículas fue menor por la clona L-6.

En conclusión los resultados obtenidos de los experimentos de fagocitosis de eritrocitos de diferentes especies, levaduras Kluyveromices lactis cepa silvestre y su mutante deficiente en NAG en la pared celular y esferas de látex aportan evidencias fuertes de que la adhesión del trofozoíto a la célula blanco, está mediada por receptores específicos ya que posiblemente dependiendo del número de receptores, como en el caso de las levaduras Kluyveromices lactis y su mutante deficiente en NAG en la pared celular y de la calidad de los mismos como en el caso de eritrocitos de diferen

tes especies la adhesión y la fagocitosis en E. histolytica serán más o menos eficiente.

Por otra parte los estudios sobre los pasos en la fagocitosis nos permite concluir que por lo menos 3 eventos son claramente distinguibles a nivel morfológico en la fagocitosis de eritrocitos : la adhesión, el movimiento de los eritrocitos hacia un polo determinado en la amiba, y la ingestión. Se sugiere que si alguno de estos pasos se limita, la eficiencia en el fenómeno de fagocitosis es menor. Será necesario realizar estudios posteriores para determinar con mayor exactitud el papel de cada uno de estos tres eventos en la fagocitosis y en el mecanismo de agresión de la amiba.

APENDICE

Medio	TYS-1-33	(1 litro)
Biosate		30 g
Dextrosa		10 g
Na Cl		2 g
K H ₂ PO ₄		0.6 g
K ₂ HPO ₄		1.0 g
Cisteína		1.0 g
Ac. Ascórbico		0.2 g
Citrato férrico		0.0236 g

Disolver los reactivos en 680 ml de agua bidestilada, ajustar a pH 6.8 y aforar a 820 ml con agua bidestilada. (colocar el medio en tubos de tapa de rosca, esterilizar y refrigerar.)

PBS Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

Para un litro de agua bidestilada

S S Solución salina isotónica	0.85%
Cloruro de Sodio	8.5 g

Para un litro de agua destilada

Solución de Alsever

Dextrosa	20.5 g
----------	--------

Citrato de Sodio	8.0 g
Acido cítrico	.55 g
Cloruro de Sodio	4.2 g

Disolver en un litro de agua destilada pH 6.1

Medio YM-1 (1litro)

Extracto de levadura	5.0 g
Peptona	10.0 g
Acido Succínico	10.0 g
Hidróxido de Sodio	6.0 g
YNB 10 x	100 ml
Glucosa 50%	20 ml

BIBLIOGRAFIA

Biaggi-F, F y Beltrán-H, F. The challenge of Amoebiasis: Understanding Pathogenic Mechanisms. Intern. Rev. Trop. Med. 3: 219, 1969.

Bos, H. J. An hypothesis about the role of the intestinal bacteria in the virulence of *E. histolytica*. Proceedings of the International Conference on Amebiasis. October 27-29, 1975.

IMSS México. pág. 551

Bos, H. y Van de Griend, J. Virulence and Toxicity of axenic *Entamoeba histolytica*. Nature 264: 341, 1977.

Bracha, R., Kobilier, D. y Mirelman, D. Attachment and Ingestion of Bacteria by Trophozoites of *Entamoeba histolytica*. Infection and Immunity. 36 : 369, 1982.

Brandt, H. y Pérez, R. Pathology of Human Amebiasis. Human Path. 1 : 351, 1970. *

Brown, C. R., Bass, H. y Coombs, P. J. Carbohydrate binding proteins involved in phagocytosis by *Acanthamoeba*. Nature 254 : 434, 1975.

Burrows, M. R., Sellwood, R. y Gibbons, R. A. Haemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 96: 269, 1976.

Cano, M. R. Caracterización de la adhesión de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* a glóbulos rojos humanos. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN 1981.

Carosi, G. Concepts of structure-function relationships in amebic organelles. Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis (1975). IMSS México. pág. 288

Cervantes, A. Estudio de los Procesos de División Celular y Nuclear en Entamoeba. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. 1980.

Compans, R. W. y Hans-Dieter, L. Viral Membranes. En: Comprehensive Virology. H. F. Conrat y R. R. Wagner (editores). Academic Press. Nueva York. 13 (5): 293, 1979.

Chávez, A., Iturbe, I., Segura, M. y Corona, D. Fagocitosis de eritrocitos humanos por Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 3, Supl. 2: 275, 1972.

Chávez, A., Iturbe, I., Segura, M. y Corona, D. Relaciones biológicas entre Entamoeba histolytica y otras células. Complejo de asociación amiba-leucocito. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 3, Supl. 2 : 241, 1972.

Chávez, A. y Segura, M. Interacción entre los trofozoítos de E. histolytica y los leucocitos de varias especies animales. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 5, Supl. 2 : 373, 1974.

Diamond, L. S., Harlow, D. R. y Cunnichk, C. C. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg. 72: 431, 1978.

Douglas, H. R. y Ballou, E. C. Isolation of Kluveromices lactis Mannoprotein Mutants by Fluorescence-activated Cell Sorting.

The Journal of Biological Chemistry. 258: 5979, 1980.

Eaton, R. D. A Surface-Active Lysosome in Entamoeba histolytica. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 63 : 678, 1969.

Eaton, R. D., Meerovitch, E. R. y Costerton, W.J. The Functional Morphology of Pathogenicity in Entamoeba histolytica. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 64, 3 : 299, 1970.

Eldson-Dew, D. The epidemiology of amoebiasis. Adv. Parasit. 6 : 62, 1968.

Ellen, R. P. y Gibbons, R. J. Protein associated adherence of Streptococcus pyogenes to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. Inf. Immun. 5 : 826, 1972.

Faust, C. E., Beaver, C. P., Jung, C. R. Animal agents and vectors of human disease. Fourth edition. Lea & Febiger. Philadelphia p. 63-66, 1975.

García-Rivera, G., Sánchez, T., Orozco, E. y Guarneros, G. Aislamiento de clones de E. histolytica deficientes en adhesión a eritrocitos humanos. Arch. Inv. Med. (Méx.) 13 : 129, 1982.

Garvey, J. S., Cremer, N. E. y Sussdorf, D. F. Reagents Cap. VI. En : Methods in Immunology. Tercera edición (1977) W. A. Benjamin, INC. Reading, Massachusetts.

Griffin, J. L. y Juniper, K. Ultrastructure of Entamoeba histolytica from human amoebic dysentery. Arch. Pathol. 21 : 271 , 1972.

Hill, R. D., Hewlett, L. E. y Pearson, D. R. Lectin binding by Giardia lamblia. Infection and Immunity. 34 : 733, 1981.

Jarumilinta R. y Maegraith, B. G. Hyaluronidase activity in - stock cultures of Entamoeba histolytica. Ann. Trop. Med. Parasitol 54 :118 , 1961.

Jarumilinta, R. y Krodolfer, F. The toxic effect of Entamoeba histolytica on leucocytes. Ann. Trop. Med. Parasitol. 58 : 375, 1964.

Knight, R. An in vitro model for measuring the cytophatic - effect of Entamoeba histolytica. J. Parasitol. 63 : 388, 1977.

Kobiler, D. y Mirelman, D. Lectin Activity in Entamoeba histolytica trophozoites. Infection and Immunity. 29 (1) : 221, 1980.

Kudo, R. R. 1976. Protozoología. Cuarta Impresión. Charles C. Thomas. Editorial Continental.

Lushbaugh, B. W., Kairalla, B. A., Loadholt, B. C. y Pittman, A. F. Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated Entamoeba histolytica. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 27 (2) : 248, 1978.

Martínez, B. M. Historia de la Amibiasis. Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis (1975). IMSS México, pág.42.

Martínez-Palomo, A., González, A., De la Torre, M. y de la Hoz R. Fijación e inclusión in situ de E. histolytica: aplicaciones en estudios de morfología y citoquímica ultramicroscópica. Arch. Inv. Med. (Méx.) 5, Supl 2 : 283, 1974.

Martínez-Palomo, A., Orozco, E. y González-Robles, A. Entamoeba histolytica: Topochemistry and dynamics of the cell surface. In the Host-Invader Interplay, Ed. H. Van den Bossche, p.p. 55-68. - Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 1980.

Martínez-Palomo, A. The biology of Entamoeba histolytica. Research Studies Press/John Wiley & Sons LTD. p. 11-15, 1982.

Mc. Caul, T. F. y Bird, R. G. Surface features of Entamoeba histolytica and rabbit Kidney (RK 13) cell surface changes after trophozoite contact. Observations by scanning electron microscopy. Int. J. Parasitol. 7 : 383, 1977.

Mirelman, D., Altman, G. y Eshdat, Y. Screening of bacterial isolates for mannose-specific lectin activity by agglutination of yeasts. J. Clin. Microbiol. 11 : 328, 1980.

Muñoz, Ma., Calderon, J. Rojkind, R. The Collagenase of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 155 : 42, 1982.

Neal, R. A. y Stewart, A. Cholesterol and virulence of Entamoeba histolytica. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 64 : 281, 1970.

Noble, R. E., Noble, A. C. Parasitology. The Biology of Animal Parasites. Lea & Febiger. Philadelphia. p. 60-64, 1976.

Novikoff, A. B., Novikoff, P. M., David, C. y Quintana, N. Studies on microperoxisomes. 11. A cytochemical method for light and electron microscopy. J. Histochem. 20 (12): 1006, 1972.

Ofek, I., Mirelman, D. y Sharon, N. Adherence of Escherichia coli to human mucosal cells mediated by mannose receptors. Nature 265 : 623, 1977.

Ofek, I., Beach, E. H., Jefferson, W. y Campbell, G. L. Cell membrane-binding properties of group A streptococcal lipoteichoic acid. J. Exp. Med. 141 : 990, 1975.

Orozco, E. Efecto Citopático de Entamoeba histolytica sobre - células en cultivo. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular) Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN 1978.

Orozco, E., Martínez-Palomo, A. y Guarneros, G. Virulencia y propiedades de superficie de varias cepas axénicas de Entamoeba histolytica Arch. Inv. Med. (Méx.) 11 : 153, 1980.

Orozco, E. Virulencia y Propiedades de Superficie de Entamoeba histolytica Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología Celular), Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. 1981.

Orozco, E., Martínez-Palomo, A., Guarneros, G., Kobilier, D. y Mirelman, D. Receptores participantes en la adherencia de E. histolytica a eritrocitos humanos. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 13, Supl. 3 : 177, 1982.

Phillips, B. P., Wolfer, P. A., Rus, C. W., Gordon, H. A., - Wright, W. H., y Reyniers, J. A. Studies on the ameba-bacteria relationship in amebiasis. Comparative results of the intracecal inoculation of germ free, monocontaminated and conventional guinea - pigs with Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 4: 675-692, 1955.

Piekarski, F. (1959). Tratado de Parasitología (Especial consideración de los parásitos del hombre), p. 831. Ediciones Aguilar, Madrid.

Ravdin, J. y Guerrant, R. Role of Adherence in Cytopathogenic Mechanisms of Entamoeba histolytica. J. Clin. Invent. 68 : 1305, -

1981.

Reinertson, J. W. y Thompson, P. E. : Experimental amebic hepatitis in hamsters, Proc. Exp. Biol. Med. 76 : 518, 1951.

Strauss, J. H., Burge, B. W. y Darnell, J. E. Carbohydrate content of the membrane protein of Sindbis virus. J. Mol. Biol. 47 : 437, 1970.

Smith, H. Microbial Surfaces in Relation to Pathogenicity . Bacteriol 41 : 475, 1977.

Trissl, D., Martínez-Palomo, A., Argüello, C., de la Torre, M. y de la Hoz, R. Surface properties related to Concanavalin A - induced agglutination. A comparative study of several Entamoeba strains J. Exp. Med. 145 : 652, 1977.

Trissl, D., Martínez-Palomo, A., de la Torre, M., de la Hoz, R. y Pérez de Suárez, E. Surface properties of Entamoeba: Increased rates of human red blood cell phagocytosis in pathogenic strains, J. Exp. Med. 148 : 1137, 1978.