

92
Rej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULAD DE CIENCIAS

**OBTENCION Y CARACTERIZACION DE MUTANTES
DE Entamoeba histolytica CON ICR-170**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
ROSAURA HERNANDEZ RIVAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEX. D. F.

FEBRERO 1987.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ABREVIATURAS

-A	Adenina.
-Adh ⁻	Amibas deficientes en adhesión.
-BB	Buffer de boratos.
-Bp	B-propiolactona.
-BUdR	Bromo-desoxiuridina.
-BU	Bromo Uracil.
-C	Citosina.
-CA	Clona A.
-Con A	Concanavalina A.
-CR-34 Thy ⁻	Cepa bacteriana deficiente para sintetizar timidina.
-Ctp-	Amibas deficientes para producir efecto citopático sobre células epiteliales en cultivo.
-DMS	Dimetil sulfato.
-DMSO	Dimetil sulfóxido.
-DNA	Acido desoxirribonucleico.
-EES	Etil etano sulfonato.
-EFC	Eficiencia de formación de colonia.

-EI	Etilenimina.
-EMS	Etil metano sulfonato.
-EMT ^R	Amibas resistentes a emetina.
-FAG-	Amibas deficientes en fagocitosis.
-FAG+	Amibas silvestres en fagocitosis.
-G	Guanina.
-HZ	Hidrazina.
-ICR	Investigación cáncer research.
-IgG	Inmunoglobulina.
-MDCK	Medin Darby Cell Kidney (línea celular aislada de riñón de perro.
-MM	Medio mínimo.
-PBS	Solución salina amortiguadora de fosfato.
-SS	Solución salina.
-T	Timina.
-Tox ⁻	Amibas deficientes en "actividad de toxina".
-Tox ⁺	Amibas silvestres en "actividad de toxina".

- TYI-S-33 Medio para amibas de Diamond y col. (1978).
- UV Ultra-violeta.
- Vir- Amibas deficientes en virulencia.
- Vir⁺ Amibas silvestres en virulencia.
- 56/2 Medio de crecimiento para bacterias.

INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1. Estructura de la acridina y de ICR-170 y 191.
- Fig. 2. Modo de acción de las acridinas.
- Fig. 3. Curva de dosis sobrevivencia para el compuesto ICR-170.
- Fig. 4. Sensibilidad a la emetina de la clona A y los trofozoítos mutagenizados con ICR-170.
- Fig. 5. Trofozoítos sobrevivientes al primer tratamiento de selección.
- Fig. 6. Trofozoítos sobrevivientes al segundo tratamiento de selección.
- Fig. 7. Trofozoítos sobrevivientes al tercer tratamiento de selección.
- Fig. 8. Espectro de absorción de la hemoglobina.
- Fig. 9. Relación entre la absorbancia y el número de eritrocitos ingeridos.
- Fig. 10. Relación entre densidad óptica y el tiempo de incubación de las amibas con los eritrocitos.

INDICE DE TABLAS

- TABLA I. Prevalencia e incidencia de la amibiasis.
- TABLA II. Propiedades de superficie de varias especies amibianas.
- TABLA III. Eficiencia de formación de colonias de la subpoblación CA_{ICR-170 1x}.
- TABLA IV. Frecuencia de aparición de mutantes Emt^R en Entamoeba histolytica.
- TABLA V. Eritrofagocitosis de la subpoblación CA_{ICR-170 1x}.
- TABLA VI. Eficiencia de formación de colonias de las clonas CA_{ICR-170 3x}.
- TABLA VII. Eritrofagocitosis de las clonas de la subpoblación CA_{ICR-170 3x}.
- TABLA VIII. Eritrofagocitosis de las clonas aisladas subpoblación clona A_{ICR-170 3x}.
- TABLA IX. Adhesión a eritrocitos de las clonas Fag⁻
- TABLA X. Efecto citopático de las clonas deficientes en fagocitosis.
- TABLA XI. Efecto citotóxico de las clonas de la subpoblación CA_{ICR-170 3x}.
- TABLA XII. Virulencia de las mutantes deficientes en fagocitosis.

INDICE

Lista de figuras	iv
Lista de tablas	v
Abreviaturas	i
Resumen	1
I. INTRODUCCION. Generalidades.	
A) Definición de amibiasis	3
B) Clasificación taxonómica	4
C) Características biológicas de <u>E. histolytica</u>	5
D) Ciclo de vida	7
E) Patogenicidad	9
II. Factores involucrados en la virulencia de <u>Entamoeba histolytica.</u>	
A) Adhesión del trofozoíto a la célula huésped y el papel de las lectinas	11
B) Fagocitosis	14
C) Efecto citopático de <u>Entamoeba histolytica</u>	16
D) Efecto citotóxico	17
E) Eficiencia de formación de colonias en agar semisólido	19

III.	Mutagénesis.	
A)	Importancia del uso de las mutantes para estudiar fenómenos biológicos	20
B)	Mutación	22
C)	Mutagénesis química	23
D)	Mostaza nitrogenada (Acridinas)	26
E)	Derivados de acridina como mutagenos	27
	Planteamiento	29
	Objetivos	31
2.	METODOLOGIA.	
A)	Cultivo de <u>Entamoeba histolytica</u>	32
B)	Cultivo de células de la línea MDCK	32
C)	Curva de crecimiento (dosis respuesta)	33
D)	Mutagénesis	33
E)	Obtención de mutantes resistentes a emetina	34
F)	Aislamiento de trofozoítos deficientes en fagocitosis.	34
i)	Cultivo de bacterias	35
ii)	Interacción trofozoítos bacterias	36
G)	Interacción de los trofozoítos que estuvieron en contacto con bacterias BUdR	36
H)	Clonación	37
I)	Obtención de eritrocitos humanos	38
J)	Eritrofagocitosis	39

K)	Adhesión	41
L)	Virulencia <u>in vivo</u>	42
M)	Efecto citopático	42
N)	Efecto citotóxico de los extractos amibianos	44

3. RESULTADOS.

A)	Sensibilidad de <u>Entamoeba histolytica</u> a ICR-170.	46
B)	Obtención de mutantes resistentes a emetina	47
C)	Efecto de la emetina sobre <u>Entamoeba histolytica</u> Clona A en medio semisólido.	49
D)	Selección de mutantes deficientes en fagocitosis a partir de la Clona A.	51
E)	Efecto de la segunda y tercera irradiación de los trofozoítos de la clona A.	57
F)	Clonación	60
G)	Eritrofagocitosis	62
H)	Adhesión	71
I)	Efecto citopático de las clonas deficientes en fagocitosis.	72
J)	Efecto citotóxico de las clonas deficientes en fagocitosis.	76
K)	Virulencia de las subpoblaciones deficientes en fagocitosis.	78

4.	DISCUSION.	
A)	Sensibilidad de <u>Entamoeba histolytica</u> a ICR-170.	81
B)	Obtención de mutantes de <u>Entamoeba histolytica</u> resistentes a emetina.	83
C)	Efecto de la emetina sobre la Clona A, cepa HMI:IMSS.	84
D)	Selección de mutantes deficientes en fagocitosis a partir de la Clona A.	85
E)	Clonación	87
F)	Eritrofagocitosis	88
G)	Adhesión	89
H)	Efecto citopático	91
I)	Efecto citotóxico	92
J)	Virulencia <u>in vivo</u>	93
	Conclusiones	95
	Bibliografía	97
	Apéndice	111

RESUMEN

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE MUTANTES DE E. histolytica
CON ICR-170.

El objetivo general de este trabajo fue obtener mutantes de Entamoeba histolytica utilizando como agente mutagénico al compuesto derivado de las acridinas ICR-170. En estas mutantes se analizaron algunas características y propiedades biológicas que participan en la virulencia de la amiba.

Las mutantes se obtuvieron a partir de la clona A cepa HM1-IMSS (Fag⁺, Adh⁺, Ctp⁺, Tox⁺, Vir⁺), después de incubar a los trofozoítos de estas cepas con 20 ug/ml de ICR-170 durante 24 hs. Para comprobar el efecto mutagénico de este compuesto sobre los trofozoítos, se analizó la aparición de células resistentes a emetina (Hernández, 1985).

Las mutantes obtenidas a partir de la clona A cepa HM1-IMSS seleccionadas por su deficiencia en fagocitosis mostraron deficiencia en varias de sus propiedades biológicas relacionadas con la virulencia.

Las 12 clonas obtenidas fagocitaron menos de la mitad de eritrocitos que fagocitó la clona A. Todas las mutantes obtenidas, mostraron una eficiencia de formación de colonia menor que la de la clona parental, hasta en un 50%.

Por otro lado, se encontró que estas clonas fueron deficientes en adhesión, lo que sugiere que tal vez existan alteraciones a nivel de membrana en las clonas obtenidas con el mutageno ICR-170, ya que otros autores han reportado que la adhesión no está directamente relacionada con la virulencia. Los trofozoítos de las 12 clonas deficientes en fagocitosis obtenidas en esta tesis, fueron también deficientes para destruir monocapas de células epiteliales de cultivo.

Cuando se midió la virulencia in vivo de estas clonas por inoculación de trofozoítos en hámsteres jóvenes, se encontró que estas mutantes también eran deficientes en virulencia. Estos resultados indican que existe una relación directa entre la fagocitosis, la virulencia y el efecto citopático y la adhesión.

Tres de las mutantes fueron deficientes en la capacidad de los extractos para destruir monocapas de células en cultivo. De acuerdo a esto, se concluye que el efecto citotóxico es una característica que puede ser considerada como factor de virulencia secundario, ya que su expresión es necesaria para que la agresividad del parásito se manifieste.

I. GENERALIDADES.

A) DEFINICION DE AMIBIASIS.

Entamoeba histolytica (Schaudinn, 1903), es el agente causal de la amibiasis humana. Esta especie vive usualmente como un comensal en el lumen del intestino grueso provocando amibiasis lumenal, pero también invade la mucosa intestinal, produciendo disentería. Los trofozoítos pueden diseminarse a través de la sangre, dando origen a lesiones extraintestinales, particularmente en el hígado y, con menos frecuencia, en el pulmón, cerebro, piel, órganos genitales, bazo y riñón (Martínez-Palomo, 1982).

La amibiasis es transmitida de hombre a hombre por coprofagia, en regiones donde las condiciones sanitarias inadecuadas junto con la pobreza, la ignorancia y la prevalencia de cepas altamente virulentas de este protozoario, se conjugan para mantener una alta incidencia de amibiasis intestinal en niños de todas las edades, y de abscesos hepáticos en adultos, principalmente hombres (Martínez-Palomo y col., 1980a).

Aunque la mayor incidencia de amibiasis se ha observado en zonas tropicales, la amiba se considera como un parásito de tipo cosmopolita y se ha observado que existen aproximadamente 500 millones de seres humanos infectados con E. histolytica en el mundo, sin tomar en cuenta China (Walsh, 1986). Se ha encontrado que los lugares que presentan el mayor número de casos de infección producida

por este parásito, se localizan principalmente en Asia, Africa, América del Norte y Sudamérica.

Se ha calculado que la amiba es la responsable de una mortalidad anual de 75,000 personas, por lo que este protozooario ocupa el tercer lugar como agente causal de mortandad por parásitos, a escala global. (Tabla 1).

En México la amibiasis puede causar de 10,000 a 30,000 muertes anualmente, siendo uno de los países en el mundo en el que esta infección se presenta con mayor incidencia, ya que la proporción de la población mexicana infectada por este parásito, alcanza un 25%.

Por lo tanto, la amibiasis constituye un problema importante de parasitosis en el mundo y en especial en México y, los estudios que se realicen para comprender la relación huésped-parásito y el conocimiento de la biología molecular de este parásito, son fundamentales para el control, curación y erradicación de esta parasitosis.

B) CLASIFICACION TAXONOMICA.

E. histolytica pertenece a la superclase Sarcódina, la cual incluye protozoarios cuyas formas adultas poseen prolongaciones ondulantes denominadas pseudópodos que parten de su cuerpo, las cuales son utilizadas para capturar a sus presas y como órganos de locomoción. Los pseudópodos lobopodios característicos de las amibas sin cápsula, son grandes, con los extremos redondeados o romos y están

TABLA 1

PREVALENCIA GLOBAL E INCIDENCIA DE LA AMIBIASIS

CONTINENTE	No. DE INFECCIONES (MILLONES)	CASOS DE ENFERMEDAD (MILLONES)	MORTANDAD (MILES)
Norte y Sudamérica	90	10	10-30
Asia	290	15-30	20-50
Africa	80	10	10-30
Europa	20	0	0
Total	480	34-50	40-110

(Tomado de Walsh, 1986)

constituidos por ectoplasma y endoplasma bien definido.

La clasificación taxonómica de E. histolytica se describe a continuación:

Phyllum : Protozoa
Subphyllum : Sarcodina
Superclase : Rhizopoda
Clase : Lobosea
Orden : Amoebidae
Familia : Entamoebidae
Género : Entamoeba
Especie : Entamoeba histolytica

(Barnes, 1977).

C) CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS DE Entamoeba histolytica

Los trofozoítos de E. histolytica miden de 20 a 60 um de diámetro y son la forma invasiva de este parásito. Son organismos muy activos que emiten pseudópodos elongados y polares, con movilidad direccional progresiva y monopódica. Su temperatura de crecimiento óptimo es de 33 y 39°C, requieren de un pH entre 6.0 a 6.5 y un medio complejo para crecer. Los trofozoítos con frecuencia ingieren eritrocitos y bacterias, además de células epiteliales y sustancias particulares, como granos de almidón. En estos organismos, se diferencian claramente un ectoplasma y un endoplasma; el primero es hialino y abundante y el segundo es finamente granular y ligeramente vacuolado, además de que contiene

glucógeno y vacuolas digestivas. Sin embargo, los trofozoítos carecen de retículo endoplásmico, aparato de golgi, mitocondrias y peroxisomas; tampoco se ha descrito la presencia de tubulina o microtúbulos en su citoplasma.

El núcleo mide de 3 a 5 μm de diámetro y contiene una cromatina periférica fina, la cual se agrupa en pequeños gránulos regulares, distribuidos bajo la membrana nuclear y está constituida básicamente por RNA (Albach y col., 1980), mientras que el endosoma constituye el sitio de condensación del DNA.

El medio ambiente normal de los trofozoítos de E. histolytica, es esencialmente anaeróbico y requiere un bajo potencial redox para tener un óptimo crecimiento de cultivo. Sin embargo, las amibas son hábiles para consumir el oxígeno, a pesar de carecer de mitocondrias (Wittner, 1968; Montalvo, 1971; Weinbach y Diamond, 1974) y pueden crecer en una atmósfera que contiene más de un 5% de oxígeno. E. histolytica requiere para su crecimiento de carbohidratos específicos; glucosa o polímeros de ésta, que pueden ser convertidos en glucosa, son esenciales (Charoelap y col., 1978). La glucólisis de E. histolytica difiere considerablemente de la de muchas células animales eucarióticas en su sistema enzimático glicolítico, además los citocromos de las mitocondrias y el ciclo del ácido cítrico no están presentes en la amiba. La glicólisis amibiana tiene los mismos intermediarios que la vía clásica

Embden-Meyerhof, pero posee ciertas enzimas glicolíticas inusuales. Los pirofosfatos inorgánicos, considerados como producto final del metabolismo, son usados como fuente de energía, aunque esta energía libre es menor que la producida por el ATP. Otra fuente adicional de energía, la constituye el glucógeno, que es un componente conspicuo del citoplasma de los trofozoítos (Sharman y col., 1970).

En condiciones inadecuadas para el crecimiento de los trofozoítos, las cuales no han sido totalmente definidas, éstos segregan una pared celular, constituyendo el quiste que representa la fase infectiva del parásito. El diámetro promedio del quiste es de 12 μm y, según la madurez del mismo, presentan de 1 a 4 núcleos con la misma morfología que la del núcleo del trofozoíto (Smith y col., 1979). Como en otros miembros del orden amoebidae, los quistes jóvenes de E. histolytica contienen cuerpos cromatoides, los cuales parecen ser masas de ribosomas (Svhlá y Baker, 1961).

D) CICLO DE VIDA.

La forma infectiva de E. histolytica es el quiste y puede vivir fuera del hospedero por semanas o meses y no es destruido ni por el calor, ni por la sequía. Cuando el quiste tetranucleado llega a ser ingerido y alcanza el tracto intestinal, la exquistación se lleva a cabo, y se inicia un estado metaquistico, en donde el núcleo se divide para formar 8 núcleos. Posteriormente, se presenta una división citoplásmica que da lugar a 8 trofozoítos

(Martínez-Palomo, 1982). Los trofozoítos residen en el intestino grueso, en donde se alimentan del contenido intestinal y se reproducen por fisión binaria. Al adherirse a la mucosa producen ulceración y, si se presenta diarrea, algunas amibas son expulsadas del tracto digestivo. Los trofozoítos se dividen una o varias veces y después, bajo condiciones apropiadas, que hasta la fecha no están determinadas con exactitud pero que pueden ser la presencia de ciertos productos metabólicos, algunas bacterias, el exceso de crecimiento, la desecación, la variación en el pH y la baja temperatura entre otros factores, hacen que el trofozoíto se diferencie en quiste. De tal manera que los individuos infectados excretan más de 45 millones de quistes por día (Barker y Swales, 1972). Posteriormente, estos quistes pueden ser ingeridos con el agua o con alimentos contaminados. Así se inicia el ciclo nuevamente.

La amibiasis intestinal puede ocurrir de 2 formas:

- a) Amibiasis aguda o disentería amibiana, caracterizada por una intensa diarrea, y
- b) Amibiasis crónica o latente, caracterizada por disturbios intestinales, dolores musculares, pérdida de peso, etc.

Además, en determinadas circunstancias, la amiba puede perforar el epitelio del intestino grueso, provocando una úlcera sangrante, a través de la cual la amiba puede llegar al hígado y a veces a otros órganos, produciendo en éstos

abscesos cuya ruptura puede ser mortal (Sleigh, 1979).

E) PATOGENICIDAD.

La patogenicidad ha sido descrita como la capacidad de los microorganismos para producir enfermedades en huéspedes animales o plantas. La virulencia en cambio, es la mayor o menor capacidad de los microorganismos para causar daño. Los productos microbianos responsables de este proceso, son conocidos como los determinantes de la virulencia, y muchos de ellos son componentes de superficie (Smith, 1977). En E. histolytica la mayoría de estos factores se desconocen.

Algunos autores han encontrado que la virulencia de las cepas amibianas, correlaciona con algunas propiedades biológicas de los trofozoítos y sus extractos. Esto se ha logrado establecer tomando en cuenta la patogenicidad relativamente estable de cultivos axénicos de E. histolytica en los cuales se ha medido un número de propiedades, que han sido comparadas en cepas de diferente virulencia (Trissl et. al. 1976, 1978; Martínez-Palomo et. al. 1980b; Orozco y col., 1980) Tabla II.

Orozco y col., (1980) y Ravdin y col., (1981), han sugerido que los trofozoítos patógenos deben realizar cuando menos 3 pasos sucesivos para la manifestación de la agresividad amibiana:

- a) Adhesión a la célula blanco.
- b) Fagocitosis, y

TABLA 2

PROPIEDADES DE SUPERFICIE DE VARIAS CEPAS AMIBIANAS

PROPIEDAD	PATOGENAS	NO PATOGENAS
Efecto citopático <u>in vitro</u>	++++	+
Grado de Eritrofagocitosis	++++	+
Aglutinación con Con A	++++	+
Unión de Con A a la superficie	++++	+
Carga eléctrica de superficie	o / -	+
Adhesión a cultivos epiteliales	++	++
Velocidad de formación de casquete	++++	++++

(Martínez-Palomo y col., 1980).

c) Destrucción de la célula (efecto citopático).

Entre las propiedades amibianas que se ha sugerido participan en la virulencia de los trofozoítos en el hospedero, están: la adhesión, la eritrofagocitosis (Trissl y col., 1978, Orozco y col., 1980; Martínez-Palomo y col., 1980b) y la capacidad del trofozoíto para destruir células en cultivo (López-Revilla y Said-Fernández, 1980; Orozco y col., 1978, 1980). La adhesión de los trofozoítos de E. histolytica a las células epiteliales, es el primer paso en el proceso de la colonización y de invasión de los tejidos (Chevez y col., 1972; Orozco y col., 1980). Por lo tanto, se considera un importante factor en la virulencia amibiana y el evento inicial en la citólisis dependiente de contacto (Jarumilinta y Kradolfer, 1964; Eaton y col., 1970; Knight y col., 1975; Ravdin y col., 1980) y en la fagocitosis (Trissl y col., 1978). La aglutinación con lectinas del tipo de la Concanavalina A, se ha reportado como exclusiva de las cepas virulentas estudiadas hasta la fecha (Trissl y col., 1976; Bos y Van de Griend 1978). Sin embargo, otros autores mencionan que la aglutinación con Con A no correlaciona directamente con la virulencia de las cepas amibianas (Orozco, 1981; Domínguez, 1985). Además, se ha encontrado que la carga eléctrica de superficie varía entre las cepas patógenas y no patógenas; así, las cepas virulentas tienen una carga tan baja, que no puede ser medida, mientras que las no patógenas exhiben una carga eléctrica negativa (Trissl y col., 1977).

II. FACTORES INVOLUCRADOS EN LA VIRULENCIA DE E. histolytica.

A) ADHESION DEL TROFOZOITO A LA CELULA HUESPED Y EL PAPEL DE LAS LECTINAS.

La adhesión, propiedad determinada por moléculas de la superficie celular, es esencial para el reconocimiento intercelular (Grenles, 1975), y es también un factor importante de la virulencia de los microorganismos patógenos, porque les permite:

- a) establecerse
- b) multiplicarse
- c) invadir los tejidos que infectan.

Para explicar el mecanismo de la adhesión desde el punto de vista bioquímico, se requiere del conocimiento de los componentes de la superficie del patógeno, los cuales son responsables de la adherencia y además del reconocimiento del receptor correspondiente en la célula huésped (Smith y col., 1979).

Debido a que los carbohidratos presentes en glicoproteínas y glucolípidos son constituyentes importantes de la mayoría de las superficies celulares, incluyendo las de bacterias y de superficie mucosas, se sospechaba la importancia de estas moléculas en la adherencia amibiana desde hace más de 20 años.

Kobiler y Mirelman (1981) reportaron una actividad de

lectina en los extractos totales de los trofozoítos de E. histolytica. Esta actividad, medida como la capacidad de los extractos amibianos para aglutinar glóbulos rojos humanos, es inhibida por oligosacáridos de N-Acetil glucosamina y aparentemente tiene un papel importante en la unión del parásito con la célula huésped. La molécula responsable de la actividad de lectina amibiana está asociada a la membrana plasmática y es activa a pH 5.7-6.0, es termolabil, pierde su actividad a 37°C después de dos horas de incubación, no es específica de grupo sanguíneo, es inhibida por IgG y se encuentra en igual cantidad en cepas amibianas de diferente virulencia. Ravdin y col. (1981) reportaron otra actividad de lectina y demostraron que la adherencia amibiana a células de la línea de ovario de hámster chino (CHO) y su posterior lisis, requiere de receptores con afinidad por N-Acetil-galactosamina.

García-Rivera y col., (1982), por medio de experimentos en los que se utilizaron clones deficientes en adhesión a eritrocitos humanos, sugirieron que una lectina amibiana, capaz de aglutinar a los eritrocitos, parece estar implicada en la adhesión de los trofozoítos, tanto a los eritrocitos como a células epiteliales en cultivo.

Entre las posibles funciones de las lectinas amibianas en la patogénesis de E. histolytica, se pueden incluir la adherencia a:

- 1) bacterias como provisión de alimento, así como de

substancias bacterianas que incrementan la virulencia (Bracha y Mirelman, 1984).

- 2) Al epitelio colónico (como uno de los primeros eventos en la colonización e invasión).
- 3) A leucocitos y eritrocitos humanos como parte de las acciones agresivas del parásito y en su alimentación.
- 4) E invasión a otros tejidos del hospedero tales como hígado, bazo, cerebro, etc., en el proceso de invasión y extendimiento metastásico dando como resultado final la destrucción tisular.

Es claro el papel que juega la adhesión del trofozoíto a la célula blanco, en la destrucción de esta última. El trofozoíto hace su primer contacto con la célula, por medio de las adhesinas amibianas. Este paso se considera como el inicio de una cadena de eventos que conduce a lisis rápida de la célula blanco (Ravdin y col., 1981). La destrucción de la célula blanco por la amiba requiere, además, la participación de los microfilamentos, como fue puesto en evidencia por experimentos de inhibición del efecto citopático, utilizando citocalasina A y B, (Ravdin y Guerrant, 1981).

Todo lo anterior indica que la adhesión es fundamental en la virulencia amibiana. Sin embargo, Orozco y col. (1982) encontraron que cepas amibianas, de diferente virulencia, mostraron una eficiencia de adhesión, semejante a epitelio intestinal de cobayo y a células epiteliales de

la línea MDCK. Además, recientemente Rodríguez y Orozco (1986) demostraron que la adhesión, junto con la actividad de toxina de los extractos amibianos pueden ser considerados como factores de virulencia secundarios, ya que su expresión es necesaria para que se manifieste la virulencia, pero por sí mismas no son suficientes para que se lleve a cabo la destrucción celular por el parásito.

B) FAGOCITOSIS.

Desde que Losch describió la naturaleza hematófaga de E. histolytica la ingestión de eritrocitos humanos por parte de los trofozoítos se le ha relacionado con la capacidad patógena del microorganismo, Chávez y Segura (1974) y Trissl y col. (1978), al medir el grado de eritrofagocitosis de cepas de E. histolytica patógenas y no patógenas, encontraron que las patógenas mostraron una ingestión de eritrocitos superior a las cepas no patógenas. Orozco y col., (1980), al comparar el grado de fagocitosis de 3 cepas de diferente virulencia, encontraron una relación directa entre la cantidad de eritrocitos ingeridos y la virulencia. También Orozco y col., (1983) mediante un protocolo de selección de amibas deficientes en fagocitosis aislaron una clona que, además de ser deficiente en fagocitosis, era avirulenta. Además, encontraron que la velocidad de eritrofagocitosis de las revertantes en virulencia de esta clona, aumentó. Rodríguez y Orozco, (1986), aislaron una serie de mutantes independientes deficientes en fagocitosis y, los resultados que obtuvieron

con estas mutantes, sugieren que la fagocitosis es un factor de virulencia primario, pues todas las mutantes obtenidas, fueron avirulentas.

La eficiencia de fagocitosis depende de varios factores como: las condiciones de cultivo, fase de ciclo celular, temperatura, acidez del medio, concentración de calcio, y la presencia de carbohidratos, entre otros. Todos estos factores, determinan también la patogenicidad del parásito. (Orozco y col., 1985a).

E. histolytica presenta dos tipos de fagocitosis fácilmente distinguibles:

- a) Específica, la cual es mediada por receptores de superficie no identificados totalmente, denominados adhesinas, las que participan en la adhesión del trofozoíto a la célula blanco. La especificidad de la fagocitosis, se demuestra por la diferente afinidad de los trofozoítos para adherir e ingerir eritrocitos de varias especies de mamíferos y clases de bacterias, como ha sido reportado por algunos autores (Olguín, 1984; Ravdin y Guerrant 1981; Bracha y col., 1982).
- b) Inespecífica, es el mecanismo por el cual los trofozoítos hacen contacto con partículas fagocitables incluyendo células; puede ser un fenómeno físico no específico, como claramente sucede con la ingestión de almidón, esferas de latex, fierro, etc. Este mecanismo está probablemente mediado por fuerzas electrostáticas

y receptores no específicos.

C) EFECTO CITOPATICO DE E. histolytica.

Para evaluar el grado de virulencia in vitro de las diferentes cepas amibianas, se han desarrollado sistemas en los que se utilizan monocapas de células de mamífero en cultivo, como MDCK, células de ovario de hámster chino y células de riñón de conejo, en las cuales se mide el grado de destrucción de la monocapa, después de la interacción con las amibas. La velocidad que los trofozoítos muestran para destruir monocapas celulares, parece correlacionar directamente con el grado de virulencia de las cepas (Orozco y col., 1978; Ravdin y Guerrant, 1981; Bracha y Mirelman, 1984; Rodríguez y Orozco, 1986).

Orozco y col., (1980), midieron el efecto citopático de 3 cepas de diferente virulencia, utilizando la línea celular MDCK. Estas células constituyen un buen modelo experimental, ya que presentan características de permeabilidad y transporte, muy semejante a las de los epitelios de transporte debido a que los cultivos confluentes de células MDCK forman una capa continua de células, unidas por uniones celulares de tipo hermético, formando un epitelio bidimensional (Orozco y col., 1978). Los trofozoítos de E. histolytica destruyen la monocapa a 37°C y su destrucción es dependiente de la virulencia de la cepa amibiana, del número de trofozoítos, y del tiempo de interacción de los trofozoítos con la monocapa (Orozco y

col., 1978).

Los trofozoítos provocan en la monocapa una reducción de la resistencia eléctrica (Orozco y col., 1982; Martínez-Palomo y col., 1985). Esta disminución se debe a la ruptura de las uniones entre las células y al ensanchamiento de los espacios intracelulares. El contacto de los trofozoítos con la monocapa por un tiempo suficiente, produce un redondeamiento de las células epiteliales, seguido por un desprendimiento de éstas, del sustrato en el cual han sido cultivadas y, por último, los trofozoítos los fagocitan.

La acción citopática de E. histolytica requiere de la actividad de los trofozoítos vivos de cepas patógenas y el establecimiento de un contacto íntimo con la célula blanco. El daño producido a células de mamífero por las amibas, se lleva a cabo a través de una combinación de medios mecánicos y bioquímicos. Estos últimos probablemente involucran una toxina unida a la membrana amibiana que produce daño osmótico en la membrana plasmática de la célula blanco o bien la liberación de un producto citolítico que actúa a distancias cortas. La lisis es seguida por la ingestión de la célula dañada por medio de la fagocitosis. Finalmente, los componentes celulares fagocitados dentro de las vacuolas fagocíticas, son degradados (Martínez-Palomo, 1982).

D) EFECTO CITOTOXICO.

Se ha demostrado consistentemente que los sonicados de

E. histolytica tienen componentes que son tóxicos para células epiteliales (Lushbaugh y col., 1979) y provocan lisis de eritrocitos (Said-Fernández y López-Revilla, 1983). Lo que indica que en los extractos amibianos existe una o más moléculas con actividad tóxica y/o enzimática que probablemente participan en la virulencia del trofozoíto.

Lushbaugh y col. (1978) reportaron el efecto citotóxico de 2 cepas de E. histolytica de diferente virulencia y encontraron que se requería una menor concentración de proteína de los extractos de las cepas más virulentas para que se produjera la destrucción de la monocapa. Bos y col. (1980), demostraron que la actividad de toxina está presente en una fracción que tiene un peso molecular de 35,000 a 45,000 daltones y que es estable en un pH de 4-10. Esta molécula es degradable por tripsina y parece ser una glicoproteína, ya que es capaz de unirse a Concanavalina A (Con A) Mattern y col. (1986) encontraron que el efecto citotóxico es bloqueado por fetuina y por N-acetil-galactosamina, lo que sugiere que esta toxina amibiana tiene propiedades del tipo de las lectinas reportadas por Ravdin, (1986).

Las manifestaciones el efecto citotóxico de los extractos amibianos son:

- a) Rompimiento de uniones intercelulares,
- b) Liberación de células de la monocapa, y
- c) La formación de burbujas en las membranas de las

células de la monocapa. Probablemente esto podría relacionarse con la actividad de proteasas. Rodríguez y Orozco, (1986), obtuvieron mutantes avirulentas, cuyos extractos tienen "actividad citotóxica" similar a la presente en la clona silvestre virulenta. A partir de estos resultados, estos autores concluyeron que el efecto citotóxico por sí solo no es suficiente para que se exprese la virulencia amibiana.

E) EFICIENCIA DE FORMACION DE COLONIAS EN AGAR SEMISOLIDO.

Gillin y Diamond (1978) reportaron que la capacidad de los trofozoítos para crecer en agar semisólido se relaciona con la virulencia de las cepas amibianas, ya que encontraron que las cepas virulentas son capaces de formar colonias en agar semisólido, mientras que las cepas consideradas avirulentas forman muy pocas colonias en el agar. Además, Orozco y col., (1982) encontraron que la clona L-6, deficiente en fagocitosis y en virulencia, presentaba deficiencia para formar colonias en agar semisólido. Sin embargo, revertantes en virulencia de esta clona no recobraron la capacidad de crecer en agar semisólido (Orozco y col., 1983). Además, Suárez (1983) aisló clonas deficientes en fagocitosis y virulencia, las cuales fueron capaces de crecer en agar semisólido, aunque la eficiencia de formación de colonias de la cepa silvestre (HM1:IMSS) fue mayor que la de las subpoblaciones deficientes en fagocitosis. Por lo

cual, no se puede afirmar que la disminución en la eficiencia de formación de colonias en agar semisólido esté relacionada con la virulencia.

III. MUTAGENESIS.

A) IMPORTANCIA DEL USO DE LAS MUTANTES PARA ESTUDIAR FENOMENOS BIOLÓGICOS.

Hasta hace poco tiempo, los estudios en parásitos estuvieron enfocados, principalmente, a descripciones morfológicas y ecológicas. Sin embargo, en algunos protozoarios se han realizado ya estudios desde el punto de vista genético, principalmente en malaria y coccidia. Por ejemplo, en Eimeria y Toxoplasma se ha demostrado que puede ocurrir recombinación génica mediante el uso de marcadores genéticos de resistencia a drogas (Joyner y Norton, 1975; Pfefferkor y Pfefferkor, 1980). En Trypanosoma, se han utilizado técnicas de genética molecular, con las cuales se han identificado antígenos de superficie (Hoeijmakers y col., 1980) de este modo tanto la genética convencional como la molecular, han aportado información importante acerca de la biología básica del parásito.

La obtención de mutantes deficientes en características involucradas en la virulencia, constituyen una herramienta realmente importante para dilucidar el papel que juegan las diferentes propiedades en la patogenicidad y virulencia del parásito, ya que el conocimiento de los productos y factores

que controlan su expresión genética pueden ayudar a entender el mecanismo molecular de la expresión de la virulencia en E. histolytica, mediante la caracterización bioquímica de las mutantes.

En los estudios de genética de células eucarióticas, uno de los tipos de mutantes más utilizadas, son los de protozoarios resistentes a drogas. Para aislar mutantes resistentes a drogas, se siguen 2 protocolos de selección:

- 1) En donde se aislan mutantes resistentes a drogas por una continua selección a concentraciones crecientes del compuesto, éste produce mutaciones en varios genes, la suma de las cuales confiere el fenotipo final.
- 2) Otro donde las mutantes se aislan en un solo paso, eliminando de esta forma la posibilidad de que aparezcan células resistentes por adaptación.

Las mutaciones espontáneas ocurren tanto en células animales como en vegetales. Sin embargo, la frecuencia de mutación espontánea es baja y se ha estimado que es del orden de 1×10^{-6} divisiones celulares (Lenhinger, 1982). Esta frecuencia puede ser incrementada por el uso de agentes mutagénicos, los cuales afectan al DNA ya sea directa o indirectamente y actúan aparentemente de una manera indiscriminada a lo largo de la molécula de DNA, por lo que estos agentes son utilizados para la obtención de dichas mutantes.

B) MUTACION

El genoma no es de modo alguno una estructura inerte que almacena la información genética de modo estático, sino que constantemente está experimentando diversos cambios. Algunas de estas modificaciones son accidentales y se reparan con facilidad; por ejemplo, durante la replicación del DNA pueden producirse rupturas que son restauradas por la acción de la DNA polimerasa I y de la DNA ligasa. Análogamente, la inserción de un nucleótido erróneo, incapaz de formar un par de bases adecuado, puede ser corregido por eliminación y sustitución, gracias a la actividad de prueba de lectura de la DNA polimerasa.

Se ha observado que la frecuencia de mutación se incrementa enormemente cuando son utilizados ciertos agentes físicos como la luz UV, rayos X etc. o químicos como agentes alquilantes, acridinas, BRdU, etc. los cuales al interactuar con el DNA, producen daño que no es reparado por los mecanismos celulares, dando lugar a mutaciones permanentes y heredables (Lenhinger, 1982).

El tipo de mutantes producido por estos agentes, son de 2 tipos:

- 1) Mutantes debidas a substitución de bases, en las cuales una base es cambiada por otra, pero el número total de bases es el mismo (mutaciones puntuales). Dentro de estas, se encuentran las transversiones, en las cuales una pirimidina es reemplazada por una purina o

viceversa y las transiciones, en las cuales una pirimidina es reemplazada por otra pirimidina o una purina es reemplazada por otra purina.

- 2) Mutantes con alteración en el marco de lectura, debido a que una o un pequeño número de bases son añadidas al mensaje o substraídas de éste (Crick, 1966).

C) MUTAGENESIS QUIMICA.

Un mutageno puede ser definido como una sustancia o mezcla de sustancias que inducen cambios heredables en el material genético. La potencialidad del mutageno químico se da en función de varios factores:

- 1) La absorción, metabolismo y la excreción de la sustancia química administrada.
- 2) El transporte del químico o de sus metabolitos a través de la membrana de la célula blanco.
- 3) La interacción del agente químico, o una forma activada de éste con el DNA para formar una lesión premutacional y
- 4) La fijación de la lesión como una alteración estable en el DNA, la cual no es modificada por los procesos de replicación o de reparación (Valcovic, 1979).

Existen muchos agentes químicos que producen efectos mutagénicos; sin embargo, su acción química y su potencialidad al interactuar con el DNA, varía.

Se pueden distinguir agentes que actúan solamente

durante la replicación del DNA, como son los agentes intercalantes o análogos de bases. Otros que alteran el DNA cuando no se está replicando, tales como los agentes alquilantes y los que producen radicales libres.

Entre los agentes mutagénicos que favorecen la incorporación de bases análogas en el DNA, están:

Los uracilos halogenados, tales como el 5-Bromouracilo (BU), Clorouracilo y 5-Iodouracilo, los cuales pueden ser incorporados dentro del DNA en lugar de la timidina. La BU, puede inducir cambios de pares de bases durante la replicación del DNA y, solo ocasionalmente, la BU es incorporada en el DNA en lugar de la citosina.

La 2 aminopterina también es incorporada dentro del DNA de ciertos organismos (fago T-4 y E. coli), este compuesto induce transiciones de pares de bases similares a las producidas por BU y su efecto mutagénico, se realiza solamente durante la replicación.

El ácido nitroso es un compuesto que produce mutaciones en las 4 bases (Tessman y co., 1964). Sin embargo, su acción sobre Timidina (T) es mínima y produce la deaminación de la citosina a uracilo (U) y de adenina (A) a hipoxantina, de tal forma que da lugar a transiciones, en ambas direcciones (Michelson y Monny, 1966).

La hidroxilamina, es un mutageno que actúa solamente a pH 6-7 y exclusivamente sobre citosina (C) produciendo

transiciones de C a T (Schuster, 1961) por lo que se dice que este compuesto tiene una acción específica.

La hidrazina (HZ) rompe los anillos de pirimidina y causa la eliminación de este tipo de bases. Su efecto es más eficiente en un pH cercano a 8.5. Este compuesto induce en bajas frecuencias de mutaciones en las bacterias.

Entre los agentes alquilantes más utilizados se encuentran: Dimetil sulfato (DMS), etil metano sulfonato (EMS), etil etano sulfonato (EES), sulfuro y nitrógeno mostaza, etilenimina (EI), epóxido (Ep) y B-propiolactone (Bp).

Probablemente todos los agentes capaces de alquilar al DNA tienen algún efecto mutagénico. Muchos de ellos han sido probados en muchos sistemas tales como el maíz, Drosophila y Neurospora. Estos agentes inducen mutaciones puntuales, principalmente transiciones, rupturas y mutaciones en cromosomas. Así por ejemplo el etil metano sulfonato (EMS), es un simple agente alquilante y se conoce que produce mutaciones sin sentido con transiciones predominantemente de GC a AT. Rodríguez y Orozco (1986) obtuvieron por mutagénesis química con etil metano sulfonato, mutantes de E. histolytica con deficiencia en propiedades biológicas en la agresividad ambiental. Aislaron 10 clonas deficientes en fagocitosis; sin embargo, debido a que este mutageno solo produce mutaciones puntuales en el DNA, la frecuencia de

reversión que tienen estas clonas es alta, por lo que existe la necesidad de obtener otro tipo de mutantes de E. histolytica, cuya alteración o daño en el DNA sea difícil de reparar y lograr así clonas deficientes en virulencia que sean estables.

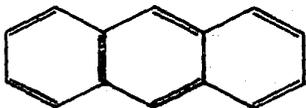
Los compuestos derivados de acridinas (ICR) han mostrado ser agentes mutagénicos eficientes, debido a que esta molécula es plana y su estructura tiene cierta semejanza con una base purínica, lo cual le permite insertarse en el DNA produciendo principalmente mutaciones de corrimiento, en el marco de lectura (Fig. 1).

D) MOSTAZA NITROGENADA (ACRIDINAS).

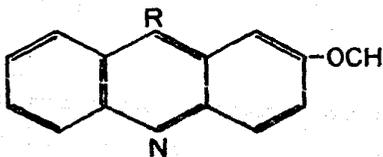
Las acridinas fueron utilizadas en un principio como colorantes vitales. Esta técnica, introducida en 1940, fue utilizada primordialmente para distinguir entre células vivas y muertas.

Sin embargo, Krieg (1954), encontró una nueva e importante propiedad de las acridinas, ya que el naranja de acridina tiñe preferencialmente al DNA de verde fluorescente y al RNA de color rojo fluorescente. Más tarde, Appel y Zanker (1962), encontraron que esta acridina tiene la capacidad de poder combinarse con el DNA, lo cual le confiere a este compuesto un potencial mutagénico.

Lerman, (1961), propuso la siguiente hipótesis para explicar la forma en que la acridina se une al DNA:



ACRIDINA



NUCLEO

ICR-191

$\text{NH}(\text{CH}_2)_3 \text{NHCH}_2 \text{CH}_2 \text{CL}$

ICR-170

$\text{NH}(\text{CH}_2)_3 \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5) \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{CL}$

(R) CADENA LATERAL

ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS DERIVADOS DE ACRIDINA (ICR)

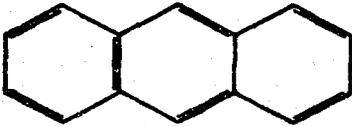
Suponiendo que un desenrollamiento local de la doble hélice puede proporcionar espacios de una profundidad apropiada para que la molécula de acridina quede intercalada a los lados, de tal manera que la hélice del DNA se extienda, sin ningún rompimiento de los puentes de hidrógeno. Así la acridina queda encerrada en el DNA. Este DNA puede diferir del DNA nativo en varias propiedades medidas en solución:

- a) La longitud de la molécula se incrementa en proporción a la cantidad de acridina unida.
- b) La extensibilidad de la hélice, la cual le permite que se lleven a cabo enrollamientos irregulares de la molécula de DNA en solución puede ser disminuído.
- c) La viscosidad intrínseca de la molécula se incrementa así como el coeficiente de sedimentación.

E) DERIVADOS DE ACRIDINAS COMO MUTAGENOS.

Se considera que la actividad mutagénica y carcinogénica de los compuestos heterocíclicos tipo mostaza, denominados ICR se debe en parte a su estructura heterocíclica, en la que por lo menos se requieren 3 anillos lineales o una estructura angular, semejantes a las que presentan las acridinas o fenantridina. Además, es importante la longitud del lado aminoalquilante de la cadena y el tipo de amina hacia los cuales el grupo 2-cloroetil está unido (Creech y col., 1972).

El efecto mutagénico de los compuestos ICR se debe a que al intercalarse en el DNA provocan un mal apareamiento



+ DNA

ACRIDINA

CGC
amino
acido
M

ATC
amino
acido
X

GGC
amino
acido
Y

TAA
amino
acido
Z

TCG
amino
acido
W

G

SECUENCIA DE BASES
DEL DNA

ACRIDINA

CGC
amino
acido
M

AT-G
amino
acido
A

GCT
amino
acido
B

AAT
amino
acido
C

CGG
amino
acido
D

MUTACION (DELECCION)
TRADUCE UNA CADENA
POLIPEPTIDICA MUTADA

de bases durante la replicación o reparación, lo cual conduce a errores de adición o delección de una o más bases (Ames, 1966; Drake, 1970). Estos mutagenos alteran el marco de lectura por la adición o delección de una sola base. Esta es la característica que distingue a estos compuestos de los mutagenos que causan substituciones de pares de bases. Su actividad mutagénica depende tanto de la parte heterocíclica de la molécula de ICR que se intercala dentro del ácido nucléico como del único grupo 2-cloroetil que posee esta molécula y que reacciona químicamente con el DNA para formar un enlace covalente. (Fig. 2).

Estos compuestos han sido ampliamente usados en mutagénesis de bacterias, por su capacidad para adicionar o deletar pares de bases. Entre los derivados de acridina más usados, se encuentra el ICR-191 y 170. Ambos contienen el mismo núcleo heterocíclico, pero tienen una pequeña diferencia en las cadenas laterales. ICR-191, es una amina secundaria e ICR-170 es una amina terciaria; esta última, es además de 3 a 5 veces más mutagénica que la anterior. Su actividad mutagénica depende más de su cadena lateral que del núcleo de la acridina, ya que este anillo proporciona un eficiente transportador de la parte alquilante de la molécula hacia el núcleo de la célula (O'Neill y col., 1978).

PLANTEAMIENTO.

La obtención de mutantes deficientes en propiedades biológicas relacionadas con la virulencia de E. histolytica constituyen una herramienta biológica importante, para el estudio de este fenómeno, ya que mediante estas mutantes, se podría llegar a establecer el papel que juega cada una de ellas, en la agresividad del parásito. Además, es posible utilizar estas mutantes como controles genéticos altamente específicos, para conocer los factores moleculares que intervienen en la manifestación de cada una de las propiedades biológicas relacionadas con la virulencia.

En este laboratorio, Orozco y Rodríguez (1986) obtuvieron mutantes deficientes en fagocitosis, utilizando como agente mutagénico al etil metano sulfonato (EMS). Sin embargo, se ha hecho necesario obtener un mayor número de mutantes que sean más estables que las aisladas con EMS. Las mutaciones puntuales producidas por el etil metano sulfonato producen generalmente proteínas alteradas, más que ausencia de éstas, debido a que son substituciones, por lo que si las mutantes se quieren utilizar como herramientas biológicas para localizar proteínas funcionales, es más conveniente obtener mutantes con deleciones o adiciones, las cuales puedan provocar la ausencia de la proteína; esto sería de gran utilidad en el estudio de la virulencia ambiana.

Una manera de obtener este tipo de mutantes consiste en

utilizar agentes mutagénicos, tales como los derivados de Acridinas ICR-170, los cuales pueden insertar o deletar pares de bases, generando de esta forma mutaciones con corrimiento en el marco de lectura.

Con este fin se mutagenizó a la Clona A (C-A) Fag⁺, Adh⁺, Ctp⁺, Tox⁺, Vir⁺) con el compuesto ICR-170. La selección de las mutantes deficientes en fagocitosis (Fag⁻) se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Clarke (1978) y por Orozco y col., (1983). La técnica consiste en alimentar a los trofozoítos de la clona parental con bacterias de E. coli cepa CR-34 Thy⁻, en las cuales la Timidina se ha substituido por BUdR, de tal manera que los trofozoítos incorporan en su DNA el BUdR acarreado por las bacterias. Posteriormente, los trofozoítos se irradian con longitud de onda menor de 310 nm, lo que produce la ruptura en el DNA en los lugares en donde se incorpora la BUdR. Las amibas que ingieren suficiente cantidad de bacterias con BUdR, mueren en el momento de la replicación; mientras que aquellos trofozoítos que no ingirieron suficiente cantidad de bacterias-BUdR sobreviven al tratamiento. Los trofozoítos sobrevivientes a la selección, se clonan en agar semisólido para obtener poblaciones homogéneas, y las clonas se pueden caracterizar en las propiedades relacionadas con la virulencia del parásito, como son: eritrofagocitosis, adhesión, actividad de toxina de los extractos amibianos, efecto citopático sobre células epiteliales en cultivo, y virulencia in vivo.

OBJETIVOS.

El objetivo general de esta tesis fue: Obtener mutantes de E. histolytica, utilizando como agente mutagénico al compuesto ICR-170, para estudiar en estas mutantes, algunas de las características y propiedades biológicas involucradas en la virulencia de este parásito para lo cual se realizará lo siguiente:

- Establecer las condiciones adecuadas de tiempo, de interacción y concentración del compuesto ICR-170 para inducir mutaciones en la clona A.
- Obtener mutantes de E. histolytica, con probable (s) alteración (es), o alteraciones en el marco de lectura de tal manera que estas mutantes sean estables e irreversibles.
- Analizar en estas mutantes, algunas características y propiedades biológicas, tales como la fagocitosis, adhesión, efecto citopático y citotóxico y la virulencia, y ver su relación con la agresividad del parásito.

MATERIALES Y METODOS.

A) Cultivo de Entamoeba histolytica.

Los trofozoítos de la clona A, así como los de las mutantes obtenidas en el presente trabajo se cultivaron axénicamente a 37°C en medio TYS-I-33 (Diamond et al, 1978) en tubos de 16 X 125 mm con tapas de rosca suplementado con: 13% de suero de bovino el cual fue previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos en un baño de agua, 3% de la mezcla de vitaminas de Diamond (North American Biologicals, U.S.A.), 0.25 UI/ml de penicilina y 35 ug/ml de estreptomycin. Una vez que los tubos con los trofozoítos alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento, se incubaron en un baño de agua-hielo durante 5 a 10 minutos, para despegar las células de las paredes del tubo, se agitaron suavemente y el inóculo deseado se sembró en tubos que contenían 10 ml de medio TYI-S-33 más 2 ml de la mezcla de suero y vitaminas.

B) Cultivo de células de la línea MDCK.

Las células de la línea celular MDCK, se cultivaron en medio de Eagle (1959), suplementado con 10% de suero de ternera (Gibco, U.S.A.) y antibióticos penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100 ug/ml. Las células se sembraron a altas densidades en placas de cultivo de 24 pozos (Corning). Se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ y aire (5:95) y se utilizaron para los ensayos de efecto citopático y citotóxico, entre 3 y 5 días después de la siembra, cuando las monocapas presentaron confluencia.

C) Curva de crecimiento (Dosis respuesta).

Para determinar la dosis más adecuada del agente químico mutagénico ICR-170 (Polysciences, Inc.) sobre los trofozoítos de E. histolytica, el crecimiento de los cultivos se midió en presencia de este compuesto. El mutageno se preparó en una solución de HCl al 0.01N (2.5 mg/ml), la cual se mantuvo protegida de la luz y a -4°C. La solución con el mutageno se esterilizó por ultrafiltración (filtro Millipore 0.22um) y se añadió a los cultivos en condiciones estériles. Las concentraciones utilizadas, fueron 10, 15, 20 y 25 ug/ml y el número de trofozoítos viables se determinó a las 24 y 36 hrs.

D) Mutagénesis.

Para la mutagénesis se utilizaron trofozoítos de la C-A, las cuales se cultivaron en botellas desechables de 25 cm² (Falcon U.S.A.), con 25 ml de medio TYI-S-33, hasta que la población alcanzó una densidad de 4×10^6 células/caja. En ese momento, se le agregó a cada caja 20 ug/ml de ICR-170 y las cajas se guardaron a 37°C, protegidas de la luz durante 24 h. Al término de este tiempo, las cajas se pusieron a enfriar en agua-hielo durante 5 a 10 min y los trofozoítos se pasaron a tubos cónicos de 50 ml para centrifugar la suspensión celular a 360 X g durante 5 min. Una vez hecho esto, el sobrenadante se decantó, eliminando de esta manera el medio con el mutageno. Las células sobrevivientes se incubaron de 24 a 48 h con medio TYI-S-33 a 37°C para

permitir la recuperación y segregación de las células.

E) Obtención de mutantes resistentes a emetina.

Una vez que los trofozoítos que estuvieron en contacto con el mutageno se dividieron al menos una vez en medio fresco, para permitir la segregación de la mutación, se procedió a seleccionar a aquellos que fueron resistentes a emetina (Emt). Para esto se inocularon 10,000 células/tubo con 12 ml de medio y se agregaron diferentes concentraciones de Emt. (6, 8, 10 y 12 ug/ml). Después de esto, los trofozoítos que quedaron en el tubo y cuando alcanzaron la fase exponencial de crecimiento, se transfirieron a medio semisólido, el cual contenía 6 ug/ml de Emt, para seleccionar a las células resistentes a este compuesto. Las colonias que crecieron en presencia de la emetina se subcultivaron en medio líquido sin la droga, por varias generaciones y se probó nuevamente su resistencia a dosis letales de Emt, tanto para la cepa silvestre como para las células mutagenizadas.

F) Aislamiento de trofozoítos deficientes en fagocitosis (FAG-).

Para la selección de los trofozoítos deficientes en fagocitosis, se utilizó la técnica descrita por Clarke para Dictyostelium discoideum (1970) y por Orozco y col. (1983) para E. histolytica, en la cual bacterias Escherichia coli cepa CR-34 Thy- se crecieron en medio suplementado con 5-Bromo-2-desoxiuridina (BUdR) (Sigma Chemical, U.S.A.) y

posteriormente se alimentó a los trofozoítos con ellas durante 3 h. Las amibas que ingirieron suficiente cantidad de bacterias e incorporaron BUdR en su genoma, y al irradiarse con luz de longitud de onda de 310 nm el DNA amibiano se rompe en los sitios de la incorporación, los trofozoítos que ingirieron una gran cantidad de bacterias murieron al momento de replicarse, sobreviviendo sólo los trofozoítos deficientes en fagocitosis.

Cultivo de Bacterias.

Para preparar las bacterias para los experimentos de selección, las bacterias E. coli cepa CR-34 Thy- se sembraron en cajas con medio Luria. Estas se incubaron por 24 h. a 37°C. Después, se aislaron una o dos colonias para sembrarse en un tubo que contenía medio 56/2c complementado con 0.5 de glucosa al 5%, 5% de casaminoácidos libres de vitaminas (Difco, USA), 1 µg/ml de tiamina (Sigma Chemical) y 50 µg/ml de timidina (Sigma Chemical). El crecimiento de las bacterias se efectuó a 37°C en agitación durante toda la noche. Los cultivos bacterianos en fase exponencial incubados con timidina, se lavaron 3 veces con medio 56/2 para eliminar los restos de timidina soluble. De la suspensión anterior, se inocularon 0.5 ml en medio 56/2, en el cual la timidina se sustituyó con 50 µg/ml de BUdR. Una vez que los cultivos llegaron a la fase exponencial de crecimiento, las bacterias se levaron 3 veces con medio 56/2, y se ajustaron a 30 Unidades Klett (1×10^8 cel/ml) con Medio Mínimo (MM) (Gillin y Diamond 1980).

Interacción trofozoíto-bacteria.

Los tubos con trofozoítos previamente mutagenizados se colocaron en agua-hielo durante 5 min., para despegar a los trofozoítos de las paredes del tubo, se centrifugaron a 360 X g durante 5 min y se lavaron una vez con MM (Gillin y Diamond, 1980). Posteriormente, 0.5 ml de la suspensión de trofozoítos, se colocaron en un tubo estéril al cual se le añadió 0.5 ml de la suspensión de bacterias. Las mezclas celulares se dejaron interaccionar durante 3 h, procurando agitar los tubos cada 20 min. Una vez transcurrido este tiempo, las mezclas celulares se lavaron una vez con el MM de Gillin y Diamond (1980) con antibióticos (1 ml de estreptomicina 100 mg/ml y penicilina 100 UI por cada 100 ml de MM.) para eliminar a las bacterias no ingeridas. El botón obtenido, se sembró en tubos con medio TYI-S-33, que contenía 0.5 ml de estreptomicina y penicilina. Los trofozoítos que estuvieron en contacto con las bacterias se incubaron a 37°C durante 24 hrs, para permitir la replicación de las amibas y la incorporación de la BUdR en su genoma.

- G) Irradiación de los trofozoítos que estuvieron en contacto con Bacterias-BUdR.

Después de la incubación por 24 hs, los trofozoítos se centrifugaron a 360 X g, se lavaron 2 veces con MM y se ajustaron a una concentración de 0.5×10^6 trofozoítos/ml de MM; un ml de esta suspensión, se pasó a cajas de petri

de 35 mm de diámetro (Lux Miles Laboratories, U.S.A.). Las tapas de las cajas de petri, se invirtieron y se llenaron con una solución de timidina (1 mg/ml), la cual actuó como filtro protector para absorber la luz de longitud de onda menor de 310 nm y evitar el daño a las células; después de esto, las cajas se colocaron sobre hielo y bajo una lámpara de luz ultravioleta aproximadamente a 10 cm. de distancia con el filtro de timidina interpuesto y en agitación suave durante 2 hs; una vez transcurrido este tiempo, los trofozoítos fueron sembrados en tubos con medio TYI-S-33 complementado con antibióticos (0.5 ml de penicilina y estreptomycin). Los trofozoítos sobrevivientes a la irradiación, se contaron cada 24 hs con la ayuda de un hematómetro, hasta que alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento. El protocolo completo se repitió 2 veces más.

H) Clonación.

Los trofozoítos sobrevivientes a los tres protocolos de selección y que alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento después del tercer tratamiento, se pusieron en agua-hielo durante 5 min y se centrifugaron a 360 X g durante 5 min y después se ajustaron a 100 o 200 trofozoítos/ml deseado. Por otro lado, en cajas de cultivo de plástico (Falcon, U.S.A.), se colocaron 31 ml de medio TYI-S-33 y se dejaron incubando a 37°C durante 60 min. Una vez realizado esto, a cada caja se le agregaron 3.3 ml de agar preparado al 5% (peso/peso) en TYI-S-33 y sin suero,

para tener una concentración final de agar de 0.58% de acuerdo a la técnica descrita por Gillin y Diamond (1978). Las cajas se agitaron vigorosamente para homogenizar el agar y a cada una de las cajas se inocularon de 100 a 200 trofozoítos. Las cajas se agitaron suavemente para que las células se distribuyeran homogéneamente en el agar. Las cajas se colocaron en agua-hielo a 4°C, en donde se mantuvieron hasta que solidificó el agar y, por último, se incubaron a 37°C por 4 a 7 días, hasta que las colonias fueron aparentes a simple vista.

La eficiencia de formación de colonias (EFC) para cada clona y cepa, se determinó como el número de colonias aparecidas, dividido entre el número de trofozoítos agregados a cada botella y multiplicado por 100.

Algunas de las colonias que crecieron en este medio, fueron extraídas del agar, utilizando pipetas pasteur estériles y se colocaron en tubos que contenían TYS-I-33 líquido.

I) Obtención de eritrocitos humanos.

Los eritrocitos humanos se obtuvieron por punción venosa, utilizando una jeringa de 5 ml, la cual contenía solución de Alsever como anticoagulante (100 ul/ml de sangre). La muestra de sangre se pasó a un tubo de tapa de rosca de 16 X 125 mm y se centrifugó a 1000 X g durante 10 min para eliminar otros elementos sanguíneos de los

eritrocitos, los cuales se lavaron 3 veces con solución de Alsever por centrifugación a $1000 \times g$ durante 10 min y después se ajustaron a 1×10^8 eritrocitos/ml en medio TYS-I-33 sin suero. Para todas las pruebas de fagocitosis y adhesión, se utilizaron eritrocitos de no más de 5 días de extraídos.

J) Eritrofagocitosis.

Para medir la velocidad de fagocitosis, se realizaron 2 protocolos, que son los siguientes:

1) Cuantificación de hemoglobina.

Los tubos de cultivo de las cepas y clonas utilizadas en este trabajo, se incubaron de 5-10 min, en un baño de agua-hielo, para despegar a los trofozoítos de las paredes del tubo, las suspensiones celulares se centrifugaron a $360 \times g$ durante 5 min y se ajustaron en medio TYI-S-33 sin suero, a 1×10^6 trofozoítos/ml. 0.5 ml de esta suspensión se pusieron en contacto con 0.5 ml de la suspensión de eritrocitos (1×10^8 eritrocitos/ml). Los tubos con las mezclas celulares se incubaron en baño maría a 37°C durante 5 y 10 min. Al término de cada tiempo, se agregaron 10 ml de agua bidestilada para lisar a los eritrocitos no ingeridos. Después de 6 min de incubación con agua bidestilada a temperatura ambiente las preparaciones se centrifugaron durante 5 min a $360 \times g$, se lavaron 3 veces con

solución salina 0.89% y se verificó al microscopio (Zeiss), que las preparaciones no tuvieran eritrocitos adheridos a las amibas y que no hubiera eritrocitos en solución, para posteriormente lisar a las células con Tritón X 100 (Sigma Chemical Col.) al 4% disuelto en solución salina. Las muestras se leyeron a una absorbancia de 540 nm.

2) Cuenta de número de eritrocitos por amiba.

Los ensayos de fagocitosis también se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Trissl y col. (1978). Los tubos con 0.4 ml de la suspensión de eritrocitos (1×10^8 /ml) y 0.4 ml de suspensión de amibas (1×10^6 amibas/ml), se incubaron en un baño maría a 37°C para permitir la fagocitosis. A los 5 minutos, se sacaron los tubos del baño maría y se agregaron 10 ml de agua bidestilada para lisar los eritrocitos no ingeridos. Después de 6 min de incubación a temperatura ambiente con agua bidestilada, los tubos se centrifugaron a 360 X g durante 5 min. Las pastillas celulares se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) por 30 min a 37°C. Las mezclas celulares se lavaron 3 veces con solución salina isotónica y los eritrocitos ingeridos fueron contrastados con la tinción de Novikoff y col., (1972), la cual consistió en incubar las mezclas celulares durante 30 min a 37°C con 0.5 ml de una solución de

2 mg/ml de diaminobencidina (Sigma Chemical) en amortiguador 2-amino-2 metil-propanodiol (Sigma Chemical) pH 9.7. A esta solución, se le agregaron 100 ul de agua oxigenada al 1% (Baker, México), con el fin de activar a la peroxidasa de los eritrocitos. Después de la tinción, las suspensiones fueron lavadas tres veces con solución salina isotónica a 360 X g durante 5 min y las pastillas obtenidas se resuspendieron en 500 ul de solución salina. Se montó una gota de la suspensión en un portaobjetos para observarse al microscopio y contar el número de eritrocitos ingeridos por 100 amibas escogidas al azar.

K) Adhesión.

Los ensayos de adhesión, se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por García Rivera y col. (1982). Tubos con 0.4 ml de la suspensión de amibas (1×10^6 amibas/ml) y 0.4 ml de la suspensión de eritrocitos humanos (1×10^8 /ml) se incubaron durante 5 y 10 min en un baño de agua-hielo para permitir la adhesión de los eritrocitos a las amibas, a los 5 y 10 min las mezclas celulares se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS durante 30 min a 37°C. Una vez hecho esto, las preparaciones se lavaron 3 veces a 110 X g durante 5 min, se desecharon los sobrenadantes y los eritrocitos adheridos fueron contrastados con la tinción de Novikoff y col. (1972). Se contó el número de eritrocitos adheridos en 100 trofozoítos con la ayuda de un microscopio.

L) Virulencia in vivo.

Los trofozoítos de las diferentes clonas fueron ajustados a 2.5×10^5 amibas en un volumen no mayor de 0.5 ml en medio TYI-S-33 sin suero, para inocularse en hámsteres machos de aproximadamente un mes y medio a dos meses de edad, en grupos de 4 animales para cada cepa amibiana, utilizando siempre a los trofozoítos de la clona como control. Los hámsteres se anestesiaron por vía intraperitoneal con Anestosal (Morden de México), inyectando 1 ml por cada 100 gr de peso del animal de una solución diluída 1:10 preparada con agua bidestilada estéril. Una vez que los animales estuvieron anestesiados, se les practicó la paratomía amplia y se localizó la vena porta, por la cual se inocularon los trofozoítos con una jeringa estéril de 1 ml. Terminada la inoculación, se restituyeron los órganos a la cavidad peritoneal y, finalmente, se cerraron los diferentes planos de la incisión; 8 días después de la infección, los hámsteres se sacrificaron para extraer el hígado, en el cual se localizó la presencia de abscesos y se estimó su tamaño.

M) Efecto citopático.

La capacidad de los trofozoítos para destruir monocapacelulares se midió de acuerdo a la técnica descrita por Orozco y col., (1978). Los trofozoítos de las clonas obtenidas por mutagénesis y de la clona parental clona A, fueron colocados en agua-hielo durante 5-10 min y se

centrifugaron a 360 X g durante 5 a 10 minutos. Las amibas se ajustaron a 5×10^4 y 1×10^5 trofozoítos/ml en medio TYS-I-33 sin suero. 0.5 ml de cada suspensión celular se pusieron en contacto con monocapas de células epiteliales de la línea MDCK cultivadas en multicámaras Linbro previamente lavadas con solución salina. Se agregaron 0.5 ml de medio TYS-I-33 sin suero a cada pozo de la multicámara y éstas se incubaron a 37°C durante 1 h; al término de este tiempo, se incubó la multicámara a 4°C durante 15 min para despegar a los trofozoítos de las monocapas, se desecharon los sobrenadantes, las multicámaras se lavaron tres veces con solución salina fría y se procedió a evaluar el grado de destrucción de la monocapa. Para medir cuantitativamente la destrucción de la monocapa, se utilizó la técnica descrita por Orozco y col.(1978) y Bracha y Mirelman (1984). Después de lavar la multicámara 3 veces, las monocapas se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente (0.5 ml/pozo). Transcurrido este tiempo las preparaciones se lavaron 3 veces con solución salina fría y se incubaron durante 10 min con 160 ul de solución de azul de metileno al 1% en amortiguador de boratos 0.01M, pH8.7 (BB). Posteriormente, se lavaron 3 veces con un ml de BB. y se extrajo el colorante absorbido por las monocapas con un ml de HCl 0.01N, agregando durante 30 min a 37°C. Por último, se tomaron 100 ul de la muestra anterior y 900 ul de HCl 0.01N y la muestra se leyó a 660 nm en el espectrofotómetro (Beckman DU-7) y a simple vista

para cuantificar el daño producido en las monocapas por los trofozoítos. El 0% de destrucción de la monocapa, se tomó de los valores registrados para las monocapas celulares que no estuvieron en contacto con los trofozoítos y como el 100% de la destrucción de la monocapa se tomó el valor registrado para las células que estuvieron en contacto con los trofozoítos de la clona parental (C-A).

N) Efecto citotóxico de los extractos amibianos.

El efecto de los extractos amibianos sobre la monocapa de la línea celular MDCK fue determinada para cada clona de acuerdo a la técnica descrita por Lushbaugh y col. (1978), Bos (1980) y Mattern y col. (1980). Los tubos de cultivo de las diferentes clonas utilizadas en este trabajo, se colocaron en un baño de agua-hielo durante 5 a 10 min. y se centrifugaron a $250 \times g$ durante 5 min. El sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó 3 veces con solución salina. La suspensión de las amibas se ajustó a 1×10^6 trofozoítos /ml de solución. Después de esto, las células se lisaron 3 a 4 ciclos de congelación-descongelación en acetona-hielo seco o en nitrógeno líquido. El lisado se centrifugó a $800 \times g$, 15 min a $4^\circ C$, se agregó al 2-B mercaptoetanol (Merck-México) a una concentración final de 0.02% y un ml de los extractos amibianos de cada clona se agregó a las monocapas en células MDCK cultivadas en multicámaras Linbro, las cuales habían sido previamente lavadas con solución salina isotónica 3 veces. Las monocapas con los extractos se

incubaron a 37°C durante 1 h o el tiempo necesario para que los trofozoítos de la clona A destruyeran las monocapas. La destrucción de la monocapa fue cuantificada de la misma manera que el efecto citopático.

RESULTADOS.

A) SENSIBILIDAD DE E. histolytica A ICR-170.

La diferente sensibilidad de las cepas amibianas a las drogas, ha sido descrita por varios autores (Entner, 1961; Entner y González 1962, López-Revilla 1978). Así mismo Hernández, (1985) y Domínguez (1985), mostraron que clonas aisladas de una misma cepa de E. histolytica tienen diferente sensibilidad a emetina y a colchicina. En la presente tesis, se estudió el efecto del agente químico derivado de las acridinas, ICR-170, sobre E. histolytica, con el fin de obtener mutantes. Se puso especial interés en realizar el trabajo con una cepa amibiana clonada y para esto se utilizó la CA, cepa HMI-IMSS, la cual es altamente fagocítica (Fag⁺), virulenta (Vir⁺) y presenta una alta eficiencia de adhesión a eritrocitos humanos (Orozco, 1981). Primeramente, se determinó la sensibilidad de esta clona al compuesto ICR-170, para definir su sensibilidad y poder determinar la dosis y el tiempo más adecuados para que se produjeran los efectos letales y mutagénicos de este compuesto sobre los trofozoítos. Los trofozoítos de la CA, se incubaron con diferentes concentraciones del mutageno ICR-170 (de 10 a 25 ug/ml) y el número de trofozoítos viables, se contó a las 24 y 36 hs después de haberse adicionado el compuesto a los cultivos.

Los resultados mostraron que el efecto del compuesto ICR-170 sobre los trofozoítos amibianos, fue dependiente de

la dosis y del tiempo de exposición al mutageno. A concentraciones de 10 ug/ml de ICR-170, se observó una disminución de aproximadamente 15% de la población, tanto a las 24 como a las 36 hs (Fig. 3). A concentraciones de 15 ug/ml, la población disminuyó hasta 56% a las 24 hs de incubación con el mutageno, mientras que a las 36 hs sólo sobrevivió el 30% de la población. Con dosis de 20 ug/ml la población sobreviviente fue de un 33% a las 24 h mientras que a las 36 h fue de un 26%.

Se eligió la dosis de 20 ug/ml de ICR-170 durante 24 h para los experimentos de mutagénesis, debido a que la viabilidad disminuyó en 67% a las 24 hs y a concentraciones más altas, los trofozoítos no sobrevivieron.

B) OBTENCION DE MUTANTES DE E. histolytica RESISTENTES A EMETINA.

Las alteraciones sufridas en el DNA por la acción del mutageno producen nuevos fenotipos, y entre los más sencillos de detectar están las resistencias a antibióticos.

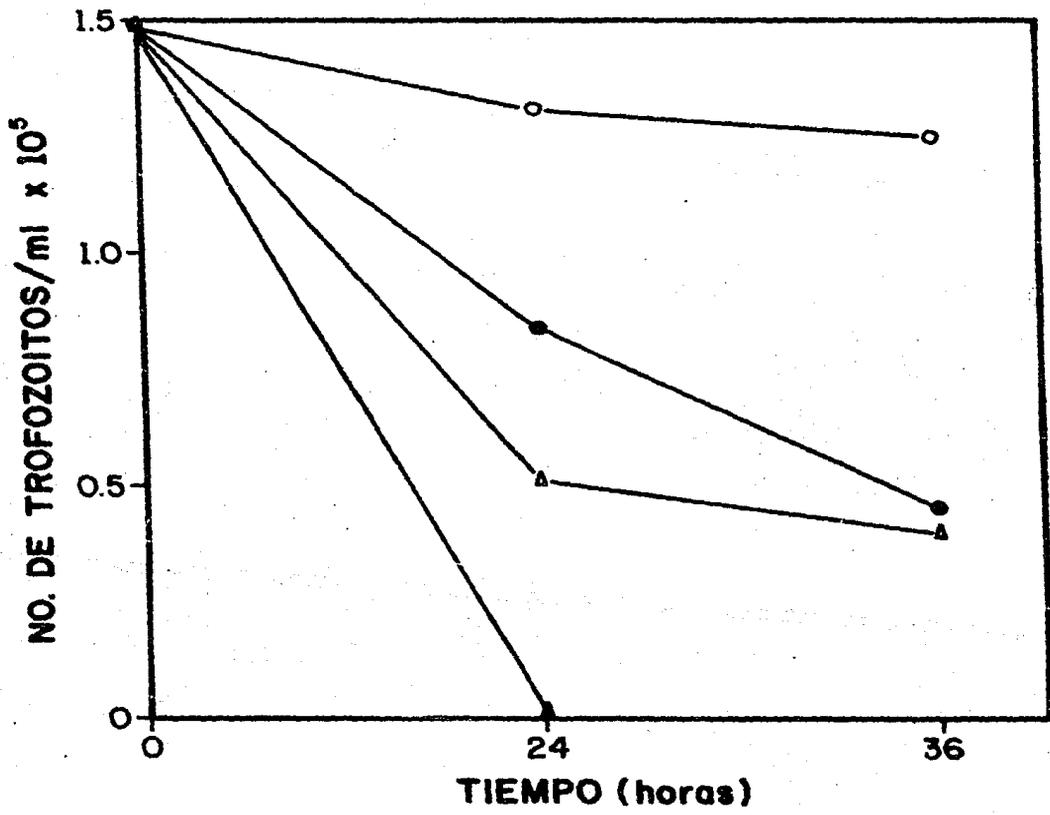
Para evaluar si el mutageno realmente estaba produciendo alteraciones en el genoma de la amiba se utilizó un marcador de referencia ya conocido. Este marcador fue la resistencia a emetina (Hernández, 1985).

A 2×10^4 amibas/tubo de la clona A mutagenizadas con ICR-170, se les agregaron diferentes concentraciones de emetina y los trofozoítos se incubaron en medio líquido a

GRAFICAS.

FIGURA 3. CURVA DOSIS SOBREVIVENCIA PARA EL COMPUESTO
ICR-170.

Trofozoitos de la CA, se incubaron con 10 ug/ml (o-o), 15 ug/ml (e-e), 20 ug/ml (Δ - Δ) 25 ug/ml (\blacktriangle - \blacktriangle) de ICR-170 y a diferentes tiempos se contó el número de trofozoitos viables.



37°C. El crecimiento relativo de los trofozoítos en presencia de emetina, se calculó a partir de las 72 h de incubación. En la figura 4, se muestra que los cultivos mutagenizados fueron capaces de crecer en presencia de hasta 10 ug/ml de emetina, mientras que los trofozoítos de la clona A, sin mutagenizar, crecieron sólo en presencia de 6 ug/ml de emetina y a concentraciones mayores de la droga, murieron. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Hernández (1985). Por otra parte, el hecho de que después del tratamiento con ICR-170 los cultivos sean capaces de crecer a concentraciones mayores de 6 ug de emetina/ml indica que el compuesto ICR-170 ha provocado mutaciones en los trofozoítos, alguna de las cuales les confieren resistencia a emetina. La frecuencia de mutación de la clona A mutagenizada con ICR-170 obtenida para resistencia a emetina en medio líquido, se obtuvo dividiendo el número de trofozoítos inoculados por tubo, entre el número de trofozoítos totales, fue de 1.66×10^{-5} .

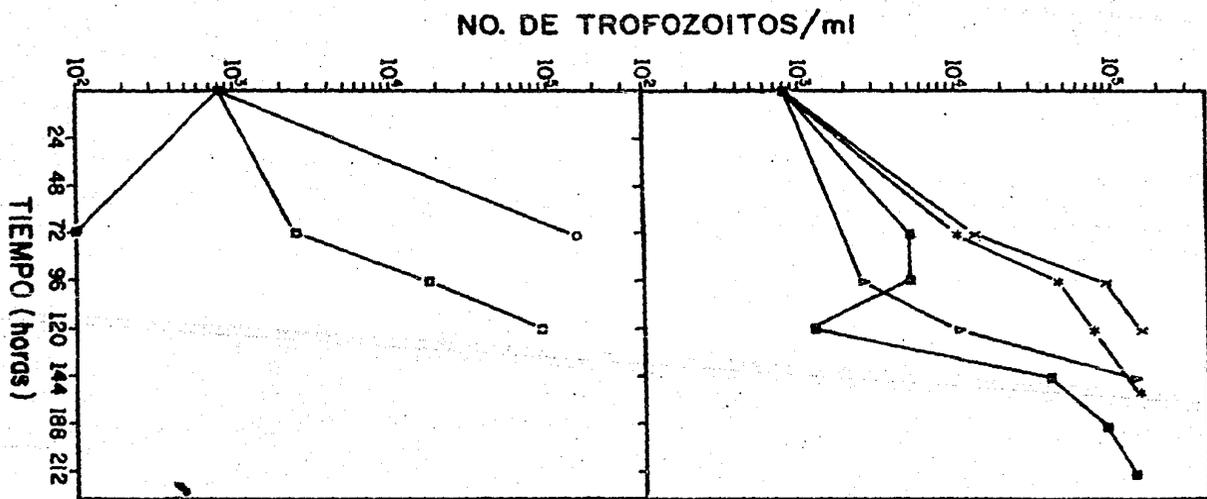
C) EFECTO DE LA EMETINA SOBRE E. histolytica CLONA A EN MEDIO SEMISOLIDO.

También se probó la capacidad de los trofozoítos de la clona A mutagenizada para crecer en agar semisólido suplementado con 6 ug/ml de emetina, como se describió en Materiales y Métodos. Se utilizó esta concentración en base a que Hernández (1985) y Orozco y col. (1985a) determinaron que la resistencia de los trofozoítos a cierto tipo de

FIGURA 4. SENSIBILIDAD A LA EMETINA DE LA CLONA A Y LOS TROFOZOITOS MUTAGENIZADOS CON ICR-170.

1×10^4 trofozoitos de la CA y trofozoitos mutagenizados fueron incubados con diferentes concentraciones de emetina:

CA 0 ug/ml (○—○), CA mutagenizada 0 ug/ml (X—X), CA 6 ug/ml (□—□), CA mutagenizada 6 ug/ml (*—*), CA 8 ug/ml (▲—▲), CA mutagenizada 8 ug/ml (△—△), CA 10 ug/ml (■—■), CA mutagenizada 10 ug/ml (●—●) y se contaron el número de trofozoitos viables después de las 72 hrs., hasta que los cultivos alcanzaron la fase exponencial de crecimiento.



drogas, en especial a la emetina, es menor cuando estos crecen en agar semisólido que en medio líquido. Además estos autores encontraron que a 6 ug/ml, los trofozoítos de la clona A son incapaces de formar colonias en agar semisólido y mueren. El número de colonias que formaron los trofozoítos mutagenizados en el agar suplementado con emetina se registró 15 días después de la inoculación de los trofozoítos (Tabla III). En la tabla IV se muestra que cuando los trofozoítos se mutagenizaron con 10 ug/ml de ICR-170 la frecuencia de mutación fue de 2.5×10^{-6} , un orden de magnitud más que el obtenido para la clona silvestre sin mutagenizar. Esta frecuencia, aumentó a 6×10^{-6} y 6.2×10^{-6} , cuando se utilizaron 15 y 20 ug/ml del mutageno respectivamente. Con estas 2 últimas concentraciones, las frecuencias de mutación obtenidas fueron muy semejantes, lo que indica que, probablemente, se llegó a un punto de saturación en el sistema.

D) SELECCION DE MUTANTES DEFICIENTES EN FAGOCITOSIS A PARTIR DE LA CLONA A.

Uno de los objetivos de esta tesis, fue obtener mutantes de E. histolytica deficientes en fagocitosis utilizando un mutageno que tuviera altas posibilidades de producir deleciones. Estas mutantes podrían presentar ausencia de una proteína cuando se compararon con la CA lo que permitiría la identificación de aquellas proteínas que participaran en la fagocitosis.

TABLA III. EFICIENCIA DE FORMACION DE COLONIAS DE LAS
SUBPOBLACIONES CA_{ICR-170 1x}

Trofozoítos en fase exponencial de crecimiento, fueron inoculados en botellas Falcon con agar semisólido, preparado con medio TYI-S-33. A los 15 días de incubación a 37°C, se contó el número de colonias. La eficiencia de formación de colonias (EFC), se determinó como el número de colonias formadas entre el número de trofozoítos inoculados.

**EFICIENCIA DE FORMACION DE COLONIAS
DE LAS SUBPOBLACIONES CA ICR - 170 IX**

SUBPOBLACION	EFICIENCIA DE FORMACION DE COLONIAS (EFC) (6 µg /ml)
CA	1.2×10^{-6}
CA MUT 10 µg/ml	5.0×10^{-6}
CA MUT 15 µg/ml	1.4×10^{-5}
CA MUT 20 µg/ml	1.5×10^{-5}

TABLA IV. FRECUENCIA DE APARICION DE MUTANTES EMT^R ENE. histolytica.

Trofozoitos en fase exponencial de crecimiento, se inocularon en botellas Falcon con medio TYI-S-33, con agar al (0.48%). A los 15 días de incubación a 37°C, se determinó el número de colonias y, la frecuencia de aparición de mutantes, se calculó como el número de colonias formadas entre el número de trofozoitos inoculados.

TABLA IV

FRECUENCIA DE APARICION DE MUTANTES EMT^R
EN E. HISTOLYTICA.

TIEMPO C/DROGA (H)	CONCENTRACION ICR-170 (µg/ml)	TIEMPO DE SEGREGACION	FRECUENCIA DE MUTACION COL EMT ^R / CEL VIABLES (6 µg / ml)
24	0	0	6.0×10^{-7}
24	10	0	2.5×10^{-6}
24	15	24	6.0×10^{-6}
24	20	24	6.2×10^{-6}
36	20	24	6.2×10^{-6}

La clona A se eligió como clona silvestre para el aislamiento de mutantes deficientes en virulencia mediante el tratamiento con el agente químico ICR-170, que está descrito que produce deleciones (Creech y col., 1972; Peck y col., 1976; Ames y Grover 1972).

Los trofozoítos de la CA se mutagenizaron con 20 ug/ml de ICR-170 durante 24 hs, en la forma como ya se describió para los experimentos de obtención de mutantes resistentes a emetina, el mutageno se retiró y la población se dejó segregarse durante 24 h. La selección de mutantes deficientes en fagocitosis, se realizó por envenenamiento de los trofozoítos altamente fagocíticos con bacterias crecidas en BUdR y su posterior irradiación con luz de longitud de onda menor a 310 nm (Clarke, 1978; Orozco y col. 1983), como se describió en Materiales y Métodos.

Después de la irradiación, la mayoría de los trofozoítos mutagenizados murieron (Fig. 5). Sin embargo, en 10 de los cultivos hubo trofozoítos viables, los cuales crecieron hasta llegar a la fase exponencial. A los trofozoítos de cultivos exponenciales se les midió el grado de fagocitosis (Tabla V). Los resultados mostraron que de los 10 cultivos que tuvieron crecimiento, nueve fueron deficientes en fagocitosis, como se aprecia en la tabla IV, ya que sólo una de ellas la subpoblación que se nombró T-2, mostró una fagocitosis semejante a la de la clona silvestre. Los cultivos que presentaron deficiencia en fagocitosis, se

FIGURA 5. CRECIMIENTO DE LAS SUBPOBLACIONES CA_{ICR-170} DESPUES DEL PRIMER TRATAMIENTO DE SELECCION.

Trofozoítos de la CA mutagenizados con ICR-170 y de la CA sin mutagenizar, se incubaron durante 3 h con bacterias Escherichia coli cepa CR-34 Thy⁻ crecidas en medio suplementado con 5 BUdR. 24 h después, los trofozoítos se irradiaron durante 2 h con luz de 310 nm y, posteriormente, se incubaron en medio TYI-S-33. El número de trofozoítos sobrevivientes al tratamiento, se determinó cada 24 hrs., hasta que los cultivos alcanzaron la fase exponencial de crecimiento.

- (●—●) Trofozoítos de la CA sin mutagenizar, alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con Timidina.
- (○—○) Trofozoítos de la CA sin mutagenizar, alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con BUdR.
- (X—X) Trofozoítos de la CA mutagenizados, alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con Timidina.
- (Δ—Δ) Trofozoítos de la CA mutagenizados, alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con BUdR.

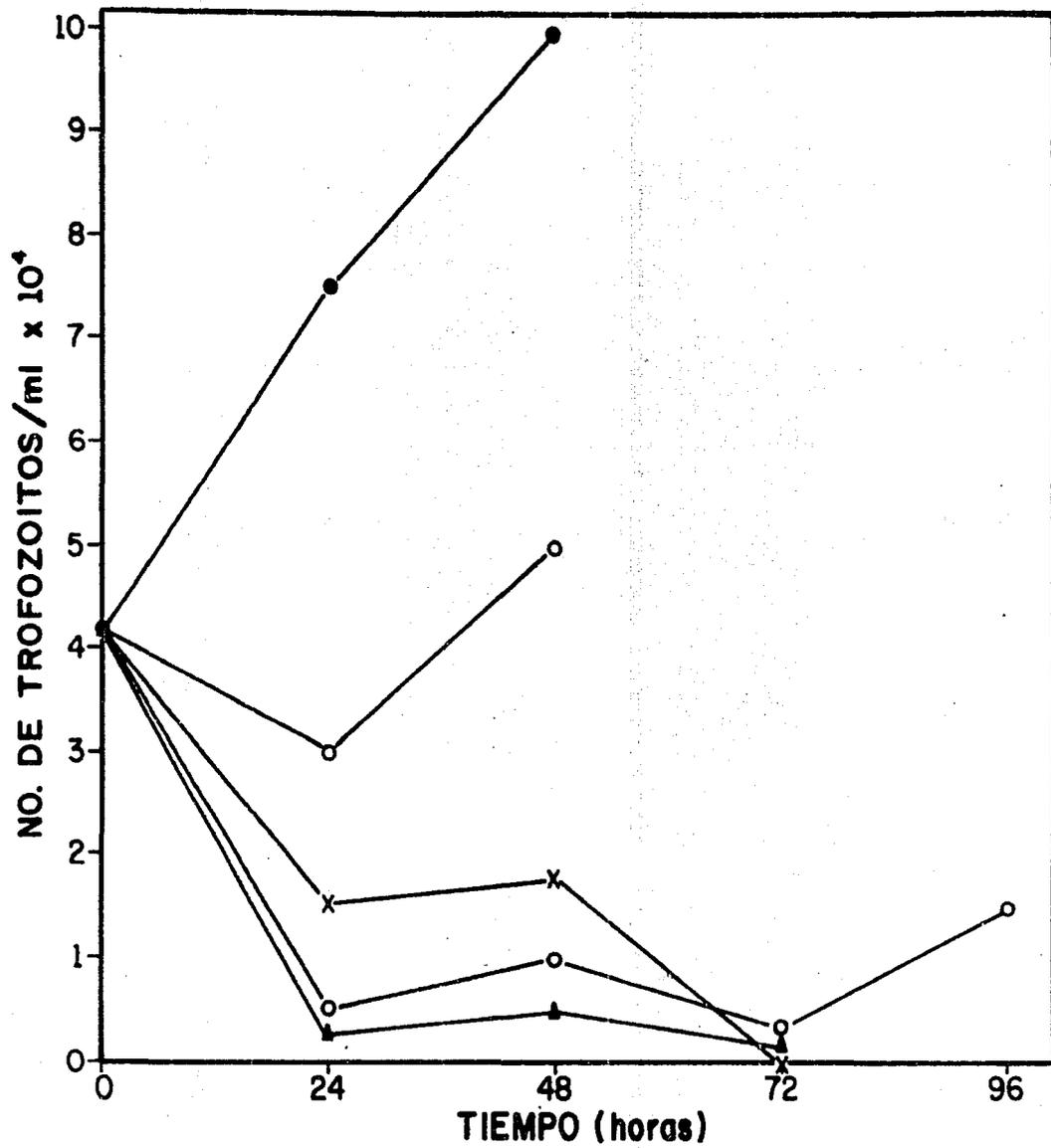


TABLA V. ERITROFAGOCITOSIS DE LA SUBPOBLACION CA_{ICR-170 1X}

Los trofozoítos de la CA, mutagenizados y seleccionados una vez y eritrocitos humanos (1:100), se incubaron durante 5 y 10 min. Una vez transcurrido este tiempo, se agregó a las preparaciones 10 ml de agua destilada, se lavaron tres veces con solución salina, se lisaron con Tritón 100X y se midió la absorbancia a 540 nm de cada una de las subpoblaciones para cada tiempo.

TABLA V

ERITROFAGOCITOSIS DE LA SUBPOBLACION

CA_{ICR-170 IX}

CLONA	ABSORBANCIA x 10 ² /AMIBA	
	5 min.	10 min.
CA	4.5	8.9
T-1	2.0	6.0
T-2	8.0	11.7
T-3	1.0	1.3
T-4	2.5	5.0
T-5	2.2	4.5
T-6	3.7	6.0
T-7	1.5	3.5
T-8	3.5	5.0
T-11	1.1	4.5

sometieron a un segundo y tercer tratamiento de selección.

E) EFECTO DE LA SEGUNDA Y TERCERA IRRADIACION SOBRE LOS TROFOZOITOS DE LA CLONA A.

Los trofozoitos de la clona A mutagenizada y sometidos al primer tratamiento de selección (CA ICR-170 1X), fueron sometidos a un segundo y tercer tratamiento de interacción con bacterias crecidas en presencia de BUdR y posterior irradiación. En la Fig. 6 y 7, se observa que no hubo una disminución significativa en la viabilidad de las poblaciones sometidas a un segundo y tercer tratamiento pues los cultivos mostraron un comportamiento similar al de los trofozoitos de la clona silvestre alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con timidina. En cambio, los trofozoitos de la clona A, sin mutagenizar y alimentados con bacterias crecidas en medio con BUdR, murieron todos. Además, el tiempo en que los cultivos de las mutantes alcanzaron la fase exponencial de crecimiento y se recuperaron de la irradiación fue más corto que el del primer tratamiento, ya que en la segunda y tercera selección los trofozoitos mostraron crecimiento a partir de los 2 días, mientras que los de la primera selección iniciaron su crecimiento hasta los 6 días. Así mismo, el número de trofozoitos viables después del primer tratamiento de selección fue muy bajo y prácticamente no se observaron trofozoitos móviles y refringentes en los tubos de cultivo hasta los 6 días después de la selección. En la segunda y

FIGURA 6. CRECIMIENTO DE LA SUBPOBLACION CA_{ICR-170 1 X}
DESPUES DEL SEGUNDO TRATAMIENTO DE SELECCION.

Trofozoítos de la CA sin mutagenizar, así como los trofozoítos sobrevivientes al primer tratamiento de selección se incubaron durante 3 h con bacterias Escherichia coli cepa CR-34 Thy⁻ crecidas en medio suplementado con 5 BUdR. 24 h después, los trofozoítos se irradiaron durante 2 hr con luz de 310 nm y, posteriormente, se incubaron en medio TYI-S-33. El número de trofozoítos sobrevivientes al tratamiento, se determinó cada 24 hs, hasta que los cultivos alcanzaron la fase exponencial de crecimiento.

- (●—●) Trofozoítos de la CA, alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con Timidina.
- (○—○) Trofozoítos de la CA, alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con BUdR.
- (△—△) Trofozoítos de la CA, mutagenizados y seleccionados una vez sometidos a un segundo tratamiento de selección, alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con BUdR.

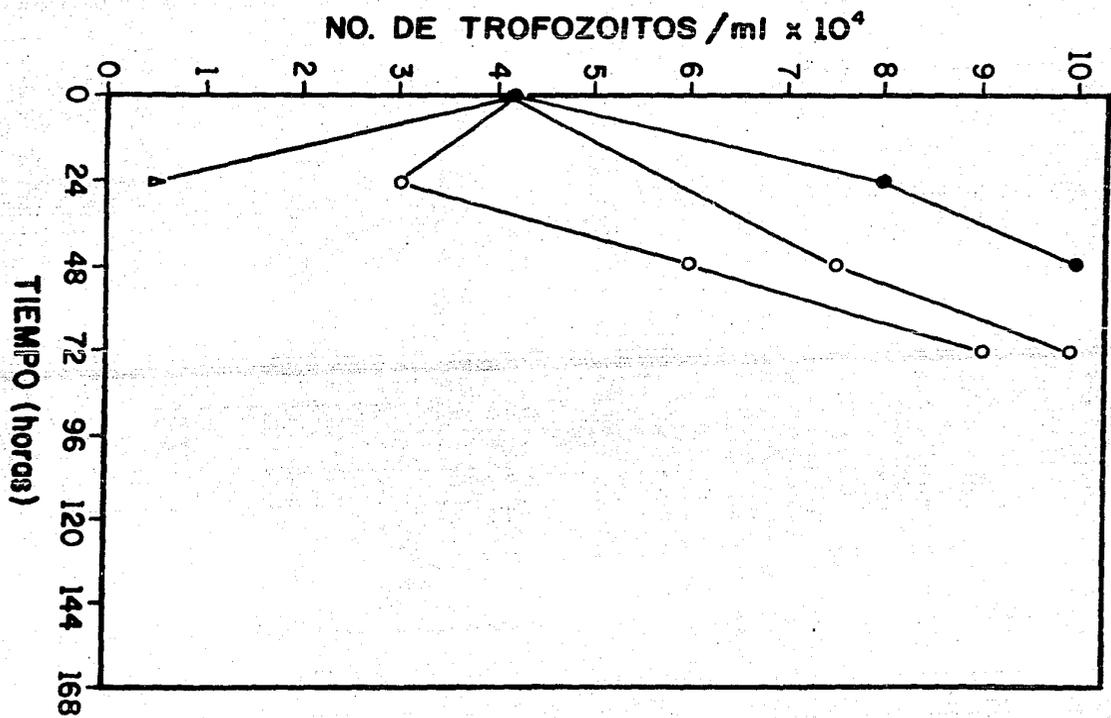
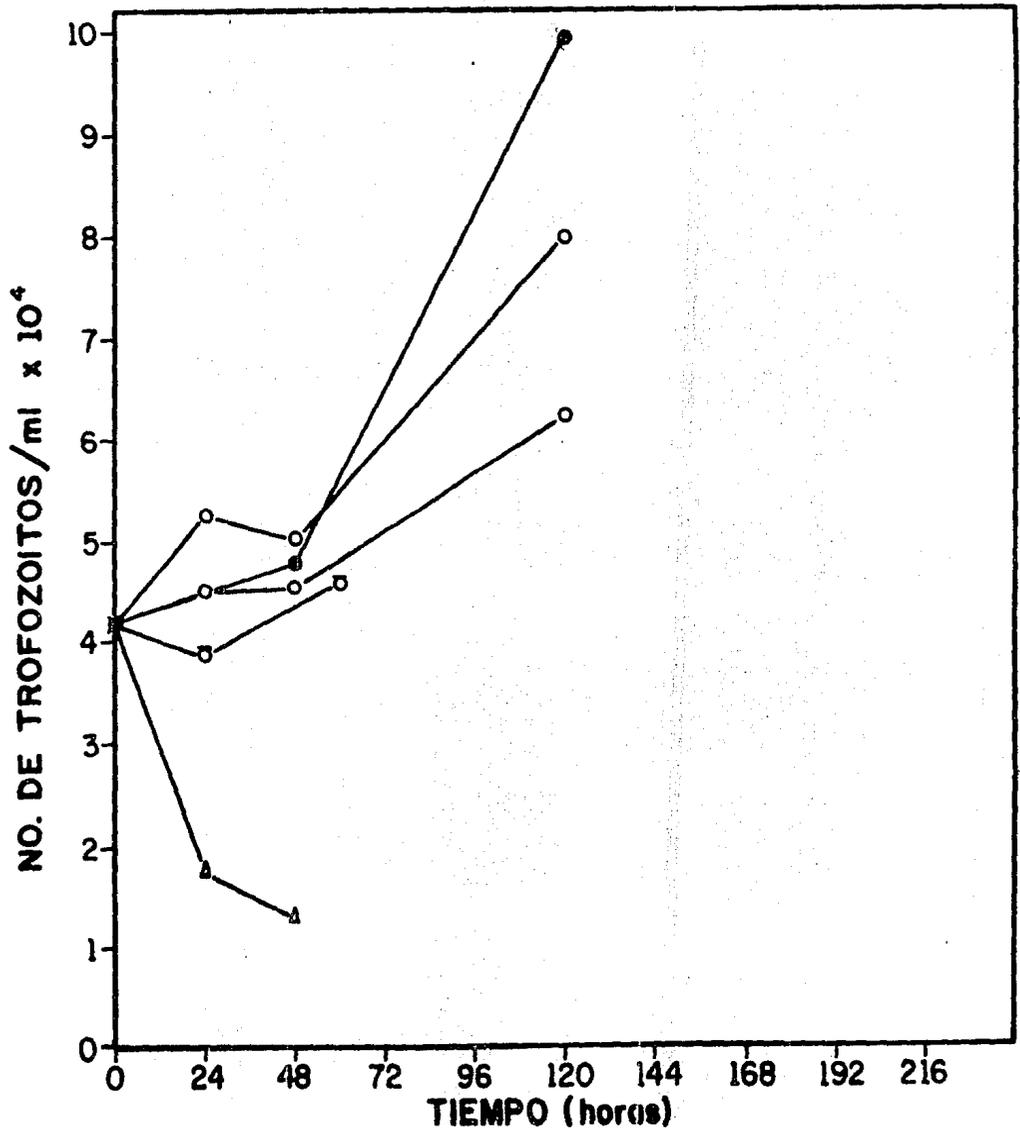


FIGURA 7. CRECIMIENTO DE LA SUBPOBLACION CA_{ICR-170 2 X}
DESPUES DEL TERCER TRATAMIENTO DE SELECCION.

Trofozoítos de la CA y la de las subpoblaciones sobrevivientes a la segunda selección, se sometieron a un tercer tratamiento de selección, con bacterias crecidas en medio suplementado con BUdR e irradiadas con luz de 310 nm. Posteriormente, se incubaron en medio TYI-S-33 y, el número de trofozoítos sobrevivientes al tratamiento, se determinó cada 24 hrs., hasta que los cultivos alcanzaron la fase exponencial de crecimiento.

- (●—●) Trofozoítos de la CA, alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con Timidina.
- (○—○) Trofozoítos de la CA, alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con BUdR.
- (Δ—Δ) Trofozoítos de la Clona A, mutagenizados y sometidos 2 veces al tratamiento, alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con BUdR.



tercera selección en cambio, el 72% de la población se mantuvo viable desde el primer día. En conclusión, con estos experimentos se obtuvieron nueve subpoblaciones deficientes en fagocitosis, las cuales fueron posteriormente sometidas a clonación en agar semisólido, para obtener poblaciones homogéneas de cada uno de los cultivos.

F) CLONACION.

Para obtener poblaciones homogéneas de trofozoítos deficientes en fagocitosis, las subpoblaciones que fueron sometidas a tres tratamientos de selección (CA-ICR-170-3X), se clonaron en agar semisólido, de acuerdo a la técnica descrita por Gillin y Diamond (1978). Después de los 8 días de incubación a 37°C de los trofozoítos en agar semisólido, se revisaron las botellas y se contó el número de colonias aparentes a simple vista, para obtener la eficiencia de formación de colonia (EFC) de cada una de las subpoblaciones. En la Tabla VI se muestran los resultados de estos experimentos. Siete de las subpoblaciones mostraron una EFC menor al 50% con respecto a la CA y dos clonas, T-3 y T-7, mostraron una EFC menor al 5% con respecto a la CA. La eficiencia de formación de colonia relativa (EFC_r) se obtuvo dividiendo la EFC de cada subpoblación, entre la EFC de la clona A y multiplicando por 100.

Dos colonias de cada botella fueron extraídas por succión, usando pipetas pasteur estériles. Se colocaron en medio líquido y se subclonaron nuevamente. Una vez que las

TABLA VI. EFICIENCIA DE FORMACION DE COLONIA DE LAS
SUBPOBLACIONES CA_{ICR-170} 3X*

50 y 100 trofozoítos, se inocularon en botellas Falcon con medio TYI-S-33 con agar al 0.48%. Siete días después de la inoculación, se contó el número de colonias para obtener la eficiencia de formación de colonia relativa (EFCr), la cual se obtuvo dividiendo la EFC de cada subpoblación, entre la EFC de la CA, multiplicado por 100.

TABLA VI

EFICIENCIA DE FORMACION DE COLONIA
DE LAS CLONAS CA_{ICR-170 3X}

SUBPOBLACION	EFICIENCIA RELATIVA DE FORMACION DE COLONIAS (EFCr) (%)
CA	100.0
T-1	53.4
T-3	4.6
T-4	33.3
T-5	10.9
T-6	21.3
T-7	3.2
T-8	41.2
T-11	49.4

clonas fueron aisladas, subclonadas y crecidas en medio líquido hasta fase logarítmica, se realizaron los ensayos de eritrofagocitosis, adhesión, efecto citopático y citotóxico y se midió la virulencia in vivo por inoculación intraportal de los trofozoítos en hámsteres de aproximadamente 100 g de peso.

G) ERITROFAGOCITOSIS.

Entre las propiedades amibianas que participan en la virulencia del trofozoíto en el hospedero, se ha descrito como una de las más importantes a la eritrofagocitosis (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1980; Martínez-Palomo y col., 1980b; Rodríguez y Orozco, 1986). Esta propiedad es comúnmente utilizada como un parámetro para medir el grado de virulencia de las diferentes cepas (Trissl y col., 1978).

Los ensayos de velocidad de eritrofagocitosis de las clonas aisladas a partir de las subpoblaciones CA_{ICR-170} 3X se realizaron utilizando dos métodos:

- a) El microscópico descrito por Trissl y col. (1978), que consiste en contar directamente en el microscopio óptico los eritrocitos ingeridos en cien trofozoítos y posteriormente obtener el promedio de eritrocitos ingeridos por amiba, y
- b) Un método bioquímico que se diseñó durante el desarrollo de esta tesis. Este método es más sencillo que el anterior, consiste en medir espectrofotométricamente la cantidad de hemoglobina

ingerida por los trofozoítos.

Se hizo un perfil espectrofotométrico de la hemoglobina, para determinar la longitud de onda a la cual hay mayor absorbancia que en este caso corresponde a 540 como se muestra en la Fig. 8; por lo que esta longitud de onda se eligió para cuantificar la cantidad de hemoglobina contenida en los eritrocitos ingeridos por los trofozoítos.

Posteriormente, se hizo una relación entre la absorbancia y el número de eritrocitos ingeridos, contados por el método tradicional, en el microscopio óptico. Como se aprecia en la Fig. 9, se observa que los resultados de estos experimentos, dieron una relación lineal cuya correlación fue de $r=0.9705$.

También se graficó la relación entre la absorbancia y el tiempo de incubación de las amibas con los eritrocitos, los resultados mostraron también una relación lineal entre el tiempo de incubación y la absorbancia de las muestras, desde 2 hasta 10 min (Fig. 10).

Los resultados obtenidos de los experimentos de medición de la velocidad de eritrofagocitosis de las clonas cuando se midió la cantidad de hemoglobina ingerida por los trofozoítos por absorbancia a 540 nm fueron cuantitativos y reproducibles, ya que al leer en un espectrofotómetro, la cantidad de hemoglobina ingerida por los trofozoítos, se evitan errores que pudiera cometer el experimentador al

FIGURA 8. ESPECTRO DE ABSORCION DE LA HEMOGLOBINA.

Varias muestras de trofozoítos incubados con eritrocitos humanos (1:100), se trataron con Tritón 100X, de acuerdo a como se describió en Materiales y Métodos y se leyó su absorbancia a diferentes longitudes de onda, para determinar mediante este perfil espectrofotométrico el pico mayor de absorbancia para la hemoglobina de los eritrocitos ingeridos por los trofozoítos.

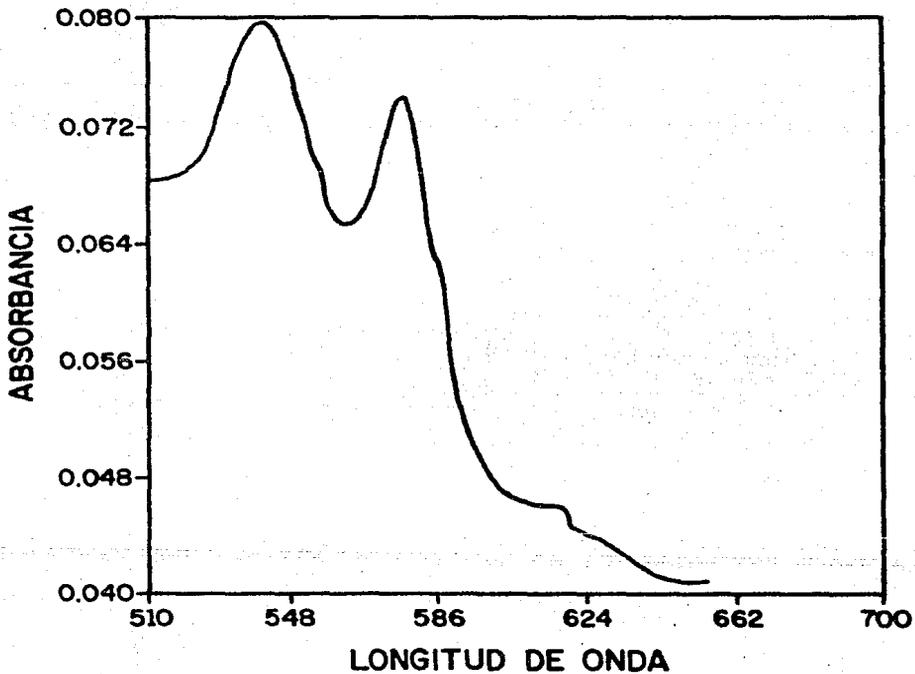


FIGURA 9. RELACION ENTRE DENSIDAD OPTICA Y NUMERO DE
ERITROCITOS INGERIDOS.

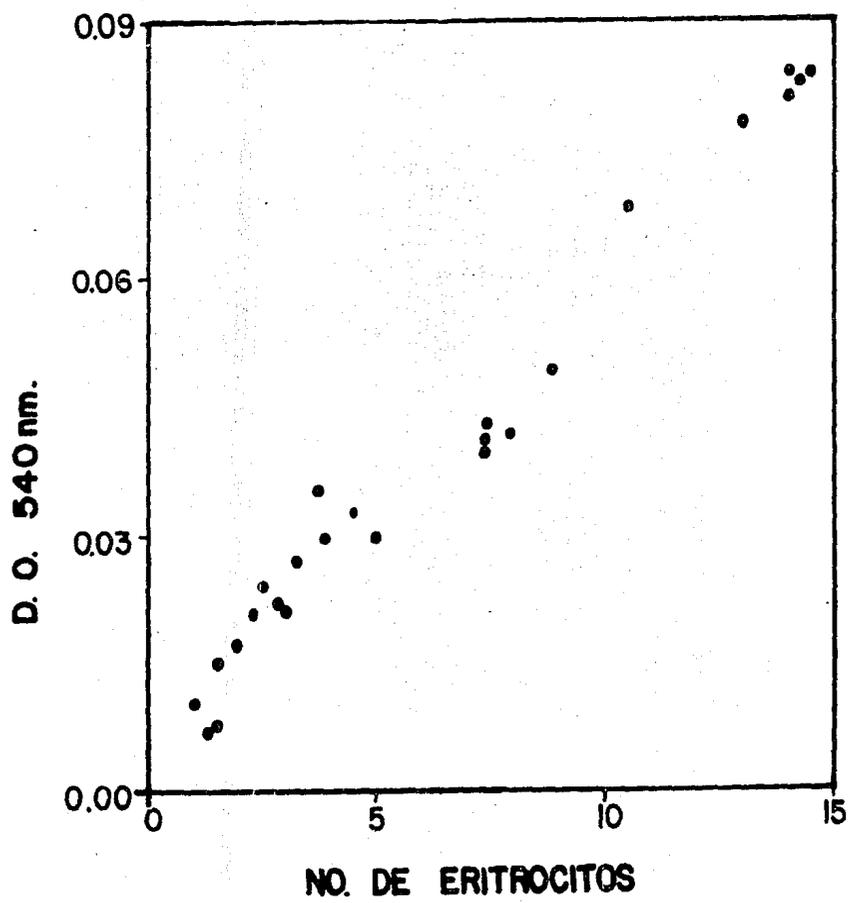
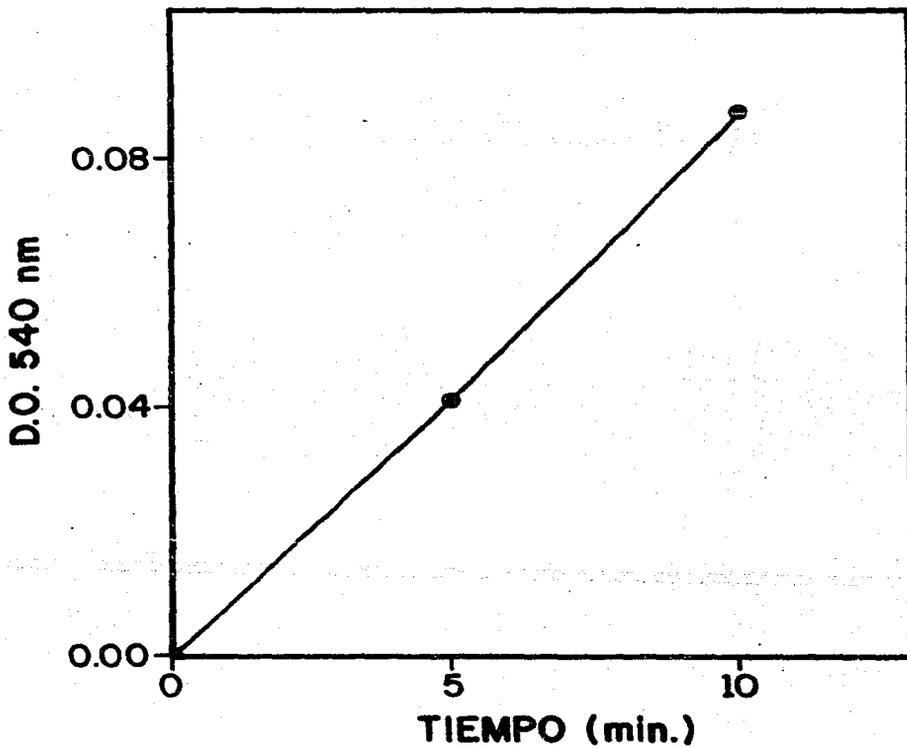


FIGURA 10. RELACION ENTRE LA ABSORBANCIA Y EL TIEMPO DE
INCUBACION DE LAS AMIBAS CON LOS ERITROCITOS.

Trofozoítos de la CA, se pusieron a interactuar con eritrocitos humanos (1:100), durante 5 y 10 min, a 37°C; al término de este tiempo, se agregó agua bidestilada para lisar a los eritrocitos no ingeridos y, posteriormente se lisaron las amibas con Tritón 100X para cuantificar por espectrofotometría la cantidad de hemoglobina ingerida.



contar el número de eritrocitos en el microscopio. Tanto en los experimentos de medición espectrofotométrica de la hemoglobina ingerida como de los que se contó el número de eritrocitos tipos de experimentos, se utilizó una relación de un trofozoíto por cada 100 eritrocitos humanos y los experimentos se realizaron a dos tiempos: 5 y 10 min.

En las Tablas VII y VIII, se muestra el promedio de eritrocitos por amiba y las D.0 540 respectivamente, de cada una de las clonas obtenidas en esta tesis y el de la clona A, que se utilizó siempre como control. Estos resultados son el promedio de cuando menos tres experimentos, en los cuales los datos obtenidos, fueron altamente reproducibles y se describen a continuación:

Como se dijo anteriormente, se aislaron dos clonas de cada una de las nueve subpoblaciones, se les midió la fagocitosis y, debido a que algunas clonas aisladas de la misma subpoblación presentaron resultados muy semejantes, sólo se escogió una de ellas para su caracterización; en total se caracterizaron 12 clonas. En la Tabla VII, se muestran los resultados de medición de la eritrofagocitosis de las clonas utilizando el método microscópico. Todas las clonas obtenidas de las subpoblaciones deficientes en fagocitosis, fagocitaron menos de la mitad del número de eritrocitos que fagocitó la CA. La clona T-43, fue la que presentó la fagocitosis más alta a los 5 min de interacción con los eritrocitos. Esta clona, a este tiempo, fagocitó un

TABLA VII. ERITROFAGOCITOSIS DE LA SUBPOBLACION CA_{ICR-170} 3X^{*}

Trofozoítos y eritrocitos humanos (1:100), se incubaron durante 5 y 10 min. Una vez transcurrido este tiempo, se agregaron 10 ml de agua bidestilada para lisar los eritrocitos no ingeridos y, posteriormente, se contrastaron con la tinción de Novikoff, para obtener el número de eritrocitos ingeridos por amiba para cada clona.

TABLA VII

ERITROFAGOCITOSIS DE LAS CLONAS DE
LA SUBPOBLACION CA_{ICR-170 3X}

CLONA	ERITROCITOS / AMIBA	
	5 min.	10 min.
CA	6.5	13.0
T-1-1	1.9	3.8
T-31	3.0	6.1
T-32	2.4	3.8
T-42	2.2	3.0
T-43	3.8	5.6
T-51	1.0	2.0
T-52	2.3	2.5
T-63	1.5	2.8
T-71	1.9	5.3
T-81	1.5	2.3
T-82	1.9	2.7
T-11	3.0	3.8

promedio de 3.8 eritrocitos/amiba, lo que corresponde al 58.5% de la fagocitosis presentada por la clona A. Sin embargo, a los 10 min, fagocitó sólo un promedio de 5.6 eritrocitos/amiba; esto es, la clona T-43 presentó una eficiencia de fagocitosis del 43%. Destacaron por su baja fagocitosis, las clonas T-51, T-52, T-63, T-71, T-81 y T-82, las cuales tuvieron, a los 10 min, una eficiencia de fagocitosis que corresponde a menos del 21.5% del de la cepa silvestre, clona A (Tabla VII).

Cuando se realizaron los experimentos de eritrofagocitosis con el método diseñado en esta tesis, el cual consiste en medir la cantidad de hemoglobina ingerida por 5×10^5 trofozoítos, los resultados correlacionaron ($r=0.9705$) directamente con los obtenidos con el método tradicional. En la tabla VIII, se muestran las D.0 540, obtenidas después de que los trofozoítos de las diferentes clonas estuvieron en interacción con eritrocitos humanos por 5 y 10 min. Los resultados son también el promedio de cuando menos tres determinaciones. Los trofozoítos de la clona A dieron lecturas a 540 nm de 0.0445 y 0.0872 a los 5 y 10 min respectivamente, mientras que con las clonas obtenidas en esta tesis, se obtuvieron lecturas que van desde 0.0100 hasta 0.0360 a los 5 min y desde 0.0150 hasta 0.0620 a los 10 min de interacción de los trofozoítos con los eritrocitos. Como puede deducirse por las desviaciones standard obtenidas, los resultados fueron altamente

TABLA VIII. ERITROFAGOCITOSIS DE LAS CLONAS AISLADAS DE LA
SUBPOBLACION CA_{ICR-170 3X}

Trofozoítos y eritrocitos humanos (1:100), se incubaron durante 5 y 10 min. Una vez concluido este tiempo, se agregaron 10 ml de agua bidestilada para lisar los eritrocitos no ingeridos y se lavaron tres veces con solución salina, las células se lisaron con Tritón 100X y se midió la absorbancia a 540 nm de cada una de las clonas para cada tiempo.

TABLA VIII

ERITROFAGOCITOSIS DE LAS CLONAS
AISLADAS SUBPOBLACION CA_{1CR-170 3X}

CLONA	ABSORBANCIA x 10 ² /AMIBA	
	5 min.	10min.
A	4.45±0.7	8.72±0.6
T-11	2.15±0.2	3.03±1.4
T-31	3.55±0.9	5.03±1.2
T-32	2.55±0.2	4.02±1.3
T-42	2.15±0.1	4.85±0.9
T-43	3.60±0.7	6.20±1.1
T-51	0.85±0.2	5.01±0.2
T-52	2.35±0.7	5.38±0.9
T-63	2.65±0.5	3.30±0.1
T-71	3.58±0.1	5.62±0.7
T-81	1.65±0.5	3.25±0.7
T-82	2.77±0.7	3.44±0.4
T-11	1.00±0.4	1.50±0.4

reproducibles. Nuevamente todas las clonas dieron una lectura menor del 50% que la obtenida con la clona A y la clona T-43 fue la que mostró la fagocitosis más alta, deducida por la lectura obtenida a 540 nm.

Si tomamos en cuenta que para la selección de mutantes deficientes en fagocitosis (Fag^-) se irradiaron 2.2×10^7 trofozoítos de la clona A y suponemos que cada una de las nueve subpoblaciones sobrevivientes provenían de cultivos con menos de 10 trofozoítos, entonces la frecuencia de aparición de mutantes deficientes en fagocitosis fue 4.1×10^{-7} la cual se obtuvo dividiendo cultivos con trofozoítos viables entre el número de células que se irradiaron. Además se encontró que los trofozoítos de la clona A son altamente homogéneos, ya que para obtener las mutantes deficientes en fagocitosis, fue necesario utilizar un agente mutagénico, lo que elimina la posibilidad de que las clonas obtenidas en este trabajo, sean variantes de E. histolytica, como podría suceder con las clonas deficientes en fagocitosis aisladas a partir de una población muy heterogénea, como la cepa HMI:IMSS (Orozco y col, 1983; Suárez, 1983).

H) ADHESION DE LAS CLONAS DEFICIENTES EN FAGOCITOSIS.

Se considera que la adhesión es uno de los primeros eventos que se llevan a cabo durante el mecanismo de agresión de la amiba a la célula blanco y que la adhesión específica precede a la fagocitosis y a la destrucción celular. Con el fin de saber si la disminución de la

fagocitosis de las clonas obtenidas en este trabajo se debía a una deficiencia en la adhesión producida por una alteración en la superficie del trofozoíto, la cual podría afectar la adhesión del trofozoíto a la célula blanco, se realizaron experimentos de interacción de trofozoítos y eritrocitos humanos (1:100) a 4°C durante, para obtener el promedio de los eritrocitos adheridos para cada clona en cada tiempo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IX, las 12 mutantes obtenidas, fueron deficientes en adhesión (Adh^-), ya que presentaron una eficiencia de adhesión menor al 50% que la mostrada por la clona A, tanto a los 5 como a los 10 min. La clona T-43, a los 5 min presentó una eficiencia de adhesión semejante a la de la clona silvestre; sin embargo, a los 10 min sólo adhirió el 50% del número de eritrocitos que adhirió la clona A. Estos resultados nos indican que, tal vez, existan alteraciones a nivel de membrana en las clonas obtenidas con el mutageno ICR-170, las cuales dieron como resultado una reducción de la adhesión y de la fagocitosis.

Si nuevamente consideramos que se irradiaron 2.2×10^7 y, suponemos que cada una de las nueve subpoblaciones provienen de una sola célula, entonces la frecuencia de mutación para la adhesión fue de 5×10^7 .

I) EFECTO CITOPATICO DE LAS CLONAS DEFICIENTES EN FAGOCITOSIS.

Uno de los métodos que se ha utilizado por la mayoría

TABLA IX. ADHESION A ERITROCITOS DE LAS CLONAS DEFICIENTES
EN FAGOCITOSIS.

Trofozoítos y eritrocitos humanos (1:100), se incubaron durante 5 y 10 min a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% y se contrastaron con la tinción de Novikoff; con la ayuda del microscopio, se contaron el número de eritrocitos adheridos en 100 amibas, obeniéndose de esta forma el promedio de eritrocitos para cada una en cada tiempo.

TABLA IX

ADHESION A ERITROCITOS DE LAS
CLONAS FAG⁻

CLONAS	ERITROCITOS ADHERIDOS / AMIBA	
	5 min.	10 min.
CA	6.5±0.8	12.6±0.6
T-H	4.0±0.9	5.0±0.9
T-31	3.5±0.8	4.1±0.8
T-32	3.2±0.1	5.0±1.0
T-42	4.1±0.9	5.3±0.9
T-43	5.6±1.0	6.3±1.0
T-51	4.5±1.0	5.0±0.1
T-52	4.0±0.9	4.7±1.1
T-63	3.1±0.9	4.5±1.5
T-71	2.9±0.1	4.5±0.6
T-81	2.8±0.3	5.0±0.1
T-82	3.5±1.0	4.8±0.9
T-11	3.0±0	3.9±0.5

de los grupos de investigación para evaluar in vitro el grado de virulencia de las diferentes clonas amibianas, ha sido la destrucción que los trofozoítos producen sobre monocapas de células de mamífero en cultivo. Los sistemas más utilizados han sido las líneas celulares CHO (Ravdin y col., 1980), y MDCK (Orozco y col., 1978), ya que se ha comprobado que, el grado de destrucción que producen los trofozoítos en este tipo de células, correlaciona directamente con la virulencia de las cepas. Con el objeto de medir la virulencia in vitro de las clonas deficientes en fagocitosis y adhesión obtenidas en esta tesis, trofozoítos de cada clona se agregaron a monocapas confluentes de la línea MDCK, y el experimento se realizó como se describió en la sección de Materiales y Métodos. En la tabla X se observa que, las 12 clonas probadas, mostraron un grado de destrucción de la monocapa menor (Cyp⁻) que el de la clona silvestre (C-A). La destrucción que produjo la clona silvestre, con el inóculo más alto, se tomó como 100% y, el que produjeron las clonas deficientes en fagocitosis, fue desde 20 hasta 68.5%. Los trofozoítos de la CA, destruyeron el 68% de la monocapa cuando se utilizó el inóculo menor de 5×10^4 . La destrucción producida por las clonas deficientes en fagocitosis y adhesión fue desde 21% hasta 52%, cuando se utilizó el inóculo más bajo. Por lo tanto, se confirmó que el efecto citopático correlaciona directamente con la

TABLA X. EFECTO CITOPATICO.

Monocapas de la línea MDCK y trofozoítos vivos se incubaron en una relación (1:1) y (0.5:1) durante 1 hr a 37°C. Posteriormente, se midió el grado de destrucción de la monocapa, como se indica en Materiales y Métodos.

TABLA X

EFFECTO CITOPATICO DE LAS CLONAS
DEFICIENTES EN FAGOCITOSIS

CLONA	DESTRUCCION DE LA MONOCAPA No. DE TROFOZOITOS	
	5×10^4	1×10^5
A	68.4	100.0
T-1-1	22.0	65.0
T-3-1	26.6	65.0
T-3-2	39.0	61.0
T-4-2	21.0	57.0
T-4-3	21.0	68.5
T-5-1	42.0	53.3
T-5-2	42.0	57.4
T-6-3	50.0	43.4
T-7-1	49.0	64.8
T-8-1	52.0	64.0
T-8-2	45.5	53.0
T-1-1	26.5	20.0

fagocitosis. Por lo que este ensayo, puede utilizarse para pruebas de virulencia in vitro. De acuerdo a los resultados que se obtuvieron con los dos inóculos, las diferencias fueron más evidentes cuando se utilizó una relación de un trofozoíto por cada célula MDCK, que cuando se utilizó 0.5 trofozoítos por célula.

J) EFECTO CITOTOXICO DE LAS CLONAS DEFICIENTES EN FAGOCITOSIS.

Se ha descrito que los extractos amibianos presentan actividad tóxica sobre las células de mamífero (Lushbaugh y col., 1978). Es probable que los factores que participan en la destrucción celular producida por los extractos amibianos, participen también en la virulencia de los trofozoítos (Martínez-Palomo y col, 1980). Con el objeto de aportar mayores evidencias sobre el papel de esta actividad en la agresividad de E. histolytica, el fenotipo de actividad tóxica de las clonas obtenidas en esta tesis, se estudió obteniendo los extractos amibianos de cada una de las clonas, utilizando la metodología descrita. La Tabla XI muestra los resultados de estos experimentos, tres de las clonas, la T-42, la T-43 y la T-63, presentaron una actividad tóxica menor (Tox^-) que la de la clona silvestre, la T-42 y la T-63 no destruyeron la monocapa y la T-43 sólo la destruyó en un 27%, en tanto que las 8 clonas restantes, mostraron una "actividad citotóxica" similar a la de la clona A. Los resultados pueden interpretarse como que esta

TABLA XI. EFECTO CITOTOXICO.

Monocapas de la línea MDCK y extractos de trofozoitos (1:10), se incubaron durante una hora a 37°C. Posteriormente, se midió el grado de destrucción de la monocapa, como se indica en Materiales y Métodos.

TABLA XI

EFFECTO CITOTOXICO DE LAS CLONAS DE LA
SUBPOBLACION CA ICR-170 3 X

CLONA	% DESTRUCCION DE LA MONOCAPA
A	100.0
T-11	69.0
T-31	74.8
T-32	88.1
T-42	0.0
T-43	27.2
T-51	31.9
T-52	44.5
T-63	0.0
T-71	78.1
T-81	69.6
T-82	98.7

actividad no es por sí misma suficiente para que se exprese la agresividad del parásito. Esto corrobora lo encontrado por Orozco y Rodríguez (1986).

K) VIRULENCIA DE LA POBLACION CA_{ICR-170 3X}

Uno de los métodos para cuantificar la virulencia de las amibas in vivo, consiste en inocular intraportalmente trofozoítos para provocar la producción de abscesos hepáticos. De tal manera que los trofozoítos de las cepas no patógenas, son incapaces de producir abscesos hepáticos y las patógenas, son capaces de producir daño en el huésped (Reinsterson y Thompson, 1951).

Para medir la virulencia de las clonas deficientes en fagocitosis obtenidas en esta tesis, se inocularon 2.5×10^5 trofozoítos de cada clona por hámster y, 8 días después de la inoculación, se extrajeron los hígados para observar la producción de abscesos. En la Tabla XII, se muestra que en las clonas deficientes en fagocitosis, la producción de abscesos fue menor (Vir^-) en un 50% que la de la clona parental (CA). La clona T-63, como la T-32, no produjeron abscesos hepáticos. Por otra parte los abscesos producidos por las clonas Fag^- fueron más pequeños y menos numerosos y se encontraban localizados en el borde de uno de los lóbulos, mientras que la CA produjo, en la mayoría de los animales, abscesos generalizados en uno o dos de los lóbulos del hígado. Estos resultados aportan una evidencia más de la relación que existe entre la fagocitosis y la virulencia.

TABLA XII. VIRULENCIA DE LAS MUTANTES FAG⁻.

2.5 X 10⁵ trofozoitos de cada una de las clonas, fueron inoculados en hámsteres jóvenes. Los animales se sacrificaron a los 8 días y se registró el número de animales que presentaron abscesos hepáticos. Se inocularon 4 hámsteres por clona.

TABLA XII

VIRULENCIA DE LAS MUTANTES FAG⁻

CLONAS	% VIRULENCIA
A	100.0
TH	22.0
T-31	33.0
T-32	0.0
T-42	14.0
T-43	17.0
T-51	3.0
T-52	24.0
T-63	0.0
T-71	19.0
T-81	19.0
T-82	22.0
T-11	47.0

DISCUSION.

Entre las funciones celulares que participa en el mecanismo de agresión de E. histolytica, se encuentran la adhesión de la amiba a la célula blanco (Ravdin y col., 1980), la colonización del tejido que invade, la posible secreción de enzimas o toxinas que faciliten su invasión (Lushbaugh y col., 1978), y la fagocitosis (Chevez y col., 1972b; Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1982, 1983, Suárez, 1983; Rodríguez y Orozco 1986). Esta última parece ser un fenómeno determinante en el efecto citopático de E. histolytica. Su importancia en la patogenicidad ha sido apoyada por varios autores, quienes han demostrado que existe una correlación directa entre el grado de eritrofagocitosis y la patogenicidad de las cepas (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1980; Martínez-Palomo, 1980b; Suárez, 1985; Rodríguez y Orozco 1986).

Las mutantes deficientes en fagocitosis proporcionan una herramienta importante para dilucidar el papel que juega este fenómeno en la virulencia amibiana. Rodríguez y Orozco (1986), obtuvieron mutantes deficientes en fagocitosis utilizando como mutageno el etil metano sulfonato (EMS) (Orozco y col. 1985), el cual es un agente químico que produce mutaciones puntuales (Meuth y Arrand, 1982), por lo que las mutantes obtenidas con este mutageno tienen una alta posibilidad de revertir. Por otra parte, las mutaciones puntuales pueden producir proteínas alteradas, más que

ausencia de éstas, por lo que si se quieren utilizar como controles negativos para localizar proteínas funcionales, es más conveniente obtener mutantes con deleciones grandes o con ausencia de la proteína. Por lo anterior, se consideró que sería de gran utilidad, en el estudio de la fagocitosis amibiana, el obtener mutantes de E. histolytica deficientes en fagocitosis, las cuales además de presentar un alto grado de estabilidad, en comparación con las obtenidas con etil mutano sulfonato, tuvieran deleciones importantes que pudieran dar como resultado la ausencia de alguna de las proteínas involucradas en la fagocitosis. Por esta razón, en esta tesis, para obtener mutantes deficientes en fagocitosis se utilizó como agente mutagénico, a un compuesto químico derivado de las acridinas, el ICR-170. Este compuesto produce mutaciones que alteran el marco de lectura, lo que podría dar como resultado la aparición de mutantes, entre las cuales podría haber mutantes que presentaran mutaciones en el marco de lectura.

A) Sensibilidad de E. histolytica a ICR-170.

El efecto mutagénico de las acridinas se debe a que se intercalan en el DNA estabilizando un mal apareamiento durante la replicación, o la recombinación, lo cual produce errores por adición o deleción de bases (Ames, 1966; Drake, 1970). ICR-170 es un compuesto heterocíclico, con un alto potencial carcinogénico, su capacidad mutagénica ha sido determinada en sistemas de células de mamífero, como son las

de la línea de ovario de hámster chino, linfoblastos diploides humanos, y células de pulmón.

Durante el desarrollo de esta tesis se encontró que el efecto de ICR-170 sobre la clona A, cepa HMI:IMSS, fue dependiente de la dosis y del tiempo de exposición al mutageno, ya que a concentraciones mayores de 10 ug/ml, el efecto de este compuesto sobre la población amibiana aumentó. Los resultados obtenidos en este trabajo en relación a la sensibilidad de E. histolytica al ICR-170, concuerdan con los reportados para células de ovario de hámster chino, y para linfoblastos humanos (O'Neill y col., 1978), aunque la dosis que se requirió para obtener mutantes de E. histolytica, fue 20 veces mayor que la utilizada para las células de mamífero mencionadas anteriormente. La menor sensibilidad de E. histolytica al ICR-170, puede deberse a:

- 1) A que los eventos bioquímicos que se requieren para la mutación, tengan caminos diferentes en las amibas y las células de mamífero.
- 2) A las diferencias existentes en los sistemas de transporte de cada tipo celular y a la diferente permeabilidad de las membranas plasmática y nuclear al mutageno, o
- 3) A la diferente organización del genoma amibiano.

Además de lo anterior, es necesario tener en cuenta que en algunos sistemas celulares que han sido mutagenizados

con acridinas, se ha utilizado dimetil sulfóxido (DMSO) como disolvente del mutageno y se sabe que este compuesto aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática (Kaden y col., 1977), permitiendo un acceso más fácil del mutageno al interior de la célula. Esto tal vez explicaría la mayor sensibilidad de las células de mamífero para ser mutagenizadas por el ICR-170, puesto que en este trabajo no se utilizó al DMSO como disolvente.

B) Obtención de mutantes de E. histolytica resistentes a emetina.

Los agentes mutagénicos, al interaccionar con los sistemas celulares, producen una serie de alteraciones en el DNA, que repercuten en las funciones que una célula normalmente realiza, produciendo cambios a nivel de una vía metabólica, que pueden expresarse fenotípicamente o no.

Algunas veces el cambio en una base, o en la posición de un gen, puede producir nuevas funciones en una célula, tales como la resistencia a antibióticos, si la frecuencia de aparición de mutantes con el nuevo fenotipo resistente aumenta después de tratar a las células con un agente químico; esto implica que el químico ha penetrado a la célula e interaccionado con el DNA para producir el fenotipo de resistencia a las drogas. Para asegurar que el ICR-170, a la concentración de 20 ug/ml, estaba produciendo mutaciones en los trofozoítos de E. histolytica, se decidió medir la

frecuencia de aparición de trofozoítos resistentes a un antibiótico.

La emetina es una droga que tradicionalmente se ha utilizado para tratar a los pacientes con infección amibiana y existen, además, varios reportes con respecto a la sensibilidad de las amibas a este compuesto (Grollman y Jarkawsk, 1975). Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha utilizado esta droga como marcador genético y se conoce la frecuencia de obtención de mutantes de E. histolytica resistentes a la emetina, tanto espontáneas como después de tratar a los trofozoítos con etil metano sulfonato. Por lo tanto, se eligió la resistencia a emetina como un marcador genético que indicara si el mutageno estaba actuando sobre los trofozoítos de la clona A, los cuales son altamente sensibles a la droga (Hernández, 1985).

C) Efecto de la emetina sobre la clona A, cepa HM1:IMSS.

Es sabido que, la resistencia de los trofozoítos amibianos a ciertos tipos de drogas, en especial a la emetina, es menor cuando éstos crecen en agar semisólido que cuando se cultivan en medio líquido (Hernández, 1985; Orozco y col., 1985). Además, se sabe que a una concentración de 6 ug/ml de emetina, los trofozoítos de la clona A, inoculados en agar semisólido, son incapaces de formar colonias y mueren. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los de Hernández (1985), ya que el número de colonias

resistentes a emetina, obtenidas en agar semisólido, se incrementó cuando los trofozoítos se trataron previamente con el compuesto ICR-170 en concentraciones mayores de 10 ug/ml. También se corroboró que los trofozoítos mostraron mayor sensibilidad a la emetina, cuando se cultivaron en medio semisólido. Este hecho podría deberse a que en el agar semisólido, la difusión de sustancias que pudiera contrarrestar la acción del compuesto se dificulten, o a que al evitarse el contacto entre los trofozoítos, no se lleven a cabo fenómenos de cooperación celular, que dieran como resultado una mayor resistencia de las células a las drogas.

D) Selección de mutantes deficientes en fagocitosis a partir de la clona A.

La estrategia de selección de trofozoítos deficientes en fagocitosis, consistió en buscar un protocolo que permitiera eliminar a los trofozoítos altamente fagocíticos y aislar las clonas que presentaran un grado menor de fagocitosis que el de la cepa silvestre. Después de que los trofozoítos de la clona A, se mutagenizaron con 20 ug/ml de ICR-170, se dejaron segregar durante 24 hs, se sometieron al tratamiento de selección, el cual comprendió la interacción de los trofozoítos deficientes en fagocitosis, de acuerdo al método descrito por Clarke (1978), para obtener mutantes de motilidad en D. discoideum y modificado por Orozco, 1981 para E. histolytica, para obtener mutantes deficientes en virulencia.

Los trofozoítos que sobrevivieron al primer protocolo de selección, fueron sometidos a dos tratamientos más. Los resultados, mostraron que las subpoblaciones obtenidas después de los otros tratamientos, presentaron una mayor viabilidad, esto sugirió que los trofozoítos ingerían un menor número de bacterias crecidas con BUdR después de cada tratamiento, o bien, si las bacterias eran ingeridas, por alguna razón este compuesto análogo de la timidina no era incorporado en el DNA amibiano; esto podría deberse, si fuera el caso, a una deficiencia en la enzima timidina kinasa. Sin embargo, los trofozoítos de las subpoblaciones aislados después de varios tratamientos, presentaron deficiencia en fagocitosis de eritrocitos humanos, lo que sugiere que es más probable que la resistencia de las subpoblaciones a los subsecuentes tratamientos se deba a una deficiencia de los trofozoítos en el proceso de ingestión.

Por todo lo anterior, podemos concluir que, el método de obtención de mutantes amibianas deficientes en fagocitosis, utilizando como mutageno ICR-170 y como método de selección el ya descrito, fue eficiente, ya que a partir de 10 cultivos de trofozoítos, sobrevivientes a los tres tratamientos de selección, 9 fueron deficientes en fagocitosis. Además de que la clona silvestre mostró ser altamente homogénea, ya que cuando no se utilizó el mutageno, no se pudieron obtener mutantes deficientes en fagocitosis.

E) Clonación.

Las subpoblaciones obtenidas después de mutagenizar a los trofozoítos, se inocularon en agar semisólido para obtener clonas, de acuerdo a la técnica descrita por Gillin y Diamond (1978). Después de 8 días de postinoculación, se contó el número de colonias aparentes a simple vista, se contó y se obtuvo la EFC. Todas las subpoblaciones presentaron una EFC menor que la de la clona silvestre. Estos resultados podrían sugerir que existe una relación entre la eficiencia para crecer en agar semisólido y la velocidad de fagocitosis de los trofozoítos, lo que significaría que la capacidad de los trofozoítos para formar colonias, aparentemente está en relación con la virulencia de las cepas amibianas, como había sido postulado por Gillin y Diamond (1978).

Sin embargo, estudios realizados por Orozco y col. (1981), Suárez (1983) y Rodríguez y Orozco (1986), demostraron que no existe una relación directa entre la capacidad de los trofozoítos, para formar colonias en agar semisólido y la virulencia de las cepas, ya que clonas deficientes en virulencia, presentaron una EFC semejante a la de la cepa silvestre. Además, revertantes virulentas y fagocíticas, obtenidas a partir de la clona L-6, la cual es deficiente en fagocitosis y en virulencia, fueron incapaces de formar colonias en agar semisólido.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, se podrían explicar sugiriendo que en el genoma de E. histolytica los genes que codifican para la capacidad de crecer en agar semisólido y la velocidad de fagocitosis, pudieran estar localizados cercanamente y, dado que el mutageno produce deleciones, éstas pudieron haber afectado a ambos genes.

F) Eritrofagocitosis.

La naturaleza hematófaga de E. histolytica, ha sido relacionada con la patogenicidad de este protozoario (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1980; Rodríguez y Orozco 1986) y ésta es una función que se ha utilizado como un parámetro para cuantificar el grado de virulencia de las diferentes cepas.

Al medir el grado de eritrofagocitosis de las clonas aisladas en esta tesis se encontró, como se esperaba en base a los resultados obtenidos con las subpoblaciones seleccionadas, que todas fueron deficientes en fagocitosis. Sin embargo, hubo diferencias; entre ellas, por ejemplo, la clona T-43, a los 5 minutos fagocitó un 60% de eritrocitos respecto a la clona A; sin embargo, a los 10 min fagocitó menos del 50%. Esto podría deberse a que, el número de receptores disponibles en la superficie de los trofozoítos, podría ser menor que el de la cepa silvestre y al saturarse con los eritrocitos, éste disminuye conforme pasa el tiempo,

por lo que su deficiencia es más evidente a tiempos mayores de 5 min. El resto de las clonas, mostraron ser deficientes tanto a los 5 min como a los 10.

Una de las aportaciones de esta tesis, fue el diseñar un método bioquímico para medir la velocidad de fagocitosis de las clonas amibianas. Este nuevo método, permite evitar los errores del experimentador al contar el número de eritrocitos en el microscopio, lo que permitió obtener resultados más exactos y reproducibles.

G) Adhesión.

El proceso de fagocitosis comprende, cuando menos, dos fases:

- a) La adhesión de la partícula a la superficie celular, y
- b) La introducción de dicha partícula al citoplasma amibiano. Se sabe que estos dos eventos son relativamente independientes, como lo demuestran los experimentos con diferentes cepas amibianas, en la que los trofozoítos que presentan adhesión semejante, como es el caso de las cepas HM1:IMSS, HM3:IMSS, HK-9 y la clona L-6 tiene una velocidad diferente de eritrofagocitosis (Orozco, 1981).

Así, la deficiencia en fagocitosis mostrada por las clonas aisladas en este trabajo, podría deberse a una deficiencia en la adhesión a la célula blanco. Para comprobar esto, se hicieron pruebas de adhesión de los trofozoítos a

eritrocitos y se encontró que todas las mutantes fueron deficientes en adhesión a la célula blanco. Este fue un resultado no esperado, ya que Suárez (1983) y Rodríguez y Orozco (1986), reportaron que solo el 33% de las mutantes deficientes en fagocitosis obtenidas con etil metano sulfonato, fueron deficientes en adhesión. No se tiene ninguna explicación para los resultados obtenidos en esta tesis, probablemente se deben al tipo de mutageno que se utilizó. Por lo que se sugiere que en estas clonas podrían estar alteradas o ausentes las moléculas de la superficie del trofozoíto, especializadas en el contacto con la célula blanco, reduciendo la adhesión y, por tanto, la fagocitosis.

La clona T-43, a los 5 min, presentó una eficiencia de adhesión similar a la de la clona parental; pero, conforme avanzó el tiempo de interacción, la deficiencia se hizo aparente. Este comportamiento puede deberse, como se expuso anteriormente, a que en la superficie del trofozoíto exista un número bajo de receptores que se saturan rápidamente y esta deficiencia se hace más aparente a tiempos más largos. La similitud entre el grado de deficiencia en adhesión y fagocitosis presentados por las clonas, confirma la relación existente entre estos dos eventos, ya que para que la ingestión se realice eficientemente, se requiere de una adhesión específica previa de los eritrocitos a la membrana plasmática de la amiba.

Todo lo anterior indica que la adhesión es fundamental en la fagocitosis amibiana. Sin embargo, Orozco y col. (1982), mostraron que cepas amibianas de diferente grado de fagocitosis, presentaron una eficiencia de adhesión, semejante a células de epitelio intestinal de cobayo, y a células epiteliales de la línea MDCK. Por último, Rodríguez y Orozco (1986), sugieren que la adhesión puede ser considerada como un factor de virulencia secundario, ya que su expresión es necesaria para que se manifieste la virulencia; pero, por sí misma, no es suficiente para que se lleve a cabo la destrucción celular por el parásito.

La frecuencia de mutación para las clonas deficientes en fagocitosis y en adhesión, fue de 4.1×10^{-7} y está dentro de los valores reportados para otros marcadores genéticos en E. histolytica (Hernández, 1985; Rodríguez y Orozco, 1986; Orozco y col., 1985) y, para otros sistemas eucarióticos, (Gupta y Siminovitch, 1977). Además, el hecho de que sólo se pudieran aislar mutantes de células que habían sido tratadas con el agente mutagénico ICR-170, indica que la población de trofozoítos que compone a la clona A, es una población homogénea, eliminando de esta forma la probabilidad de que las mutantes que se obtuvieron sean variedades de E. histolytica.

H) EFECTO CITOPÁTICO.

Con el objeto de obtener una evidencia más sobre la relación entre el efecto citopático sobre células en cultivo

y la velocidad de fagocitosis y la eficiencia de adhesión se midió la capacidad de los trofozoítos de las clonas mutantes para producir daño sobre monocapas de células en cultivo de la línea MDCK. Todas las clonas deficientes en adhesión y fagocitosis, tuvieron un efecto citopático menor (Cyp-) que el de la clona silvestre, confirmándose de esta forma la relación directa entre el efecto citopático de los trofozoítos sobre células en cultivo y la fagocitosis amibiana.

I) EFECTO CITOTOXICO.

También se caracterizó la capacidad de los extractos amibianos de las clonas deficientes en fagocitosis, para producir daño sobre células epiteliales en cultivo. De las 12 clonas aisladas, ocho de éstas, presentaron una actividad citotóxica igual que la clona A; y las tres clonas restantes T-31, T-43 y T-63, presentaron una actividad tóxica menor que la de la clona silvestre, y además que la clona T-31 y T-63, no destruyeron la monocapa. No se sabe la relación que exista entre los factores que producen la actividad de toxina en los extractos amibianos y la fagocitosis de los trofozoítos. Sin embargo, el hecho de que, al seleccionar amibas deficientes en fagocitosis, se obtengan también deficientes en actividad tóxica, sugiere que podría haber una relación entre las moléculas que participan en ambas actividades, aunque no se ha encontrado una relación directa entre la actividad de toxina y la patogenicidad de

E. histolytica. La presencia de estas 3 mutantes deficientes en "actividad de toxina" (Tox-), en fagocitosis y en efecto citopático podría sugerir que, de algún modo, esta actividad está involucrada en la agresividad amibiana en la que, se cree, participan las proteasas.

I) VIRULENCIA in vivo.

La virulencia medida in vivo, se ha relacionado directamente con dos propiedades de virulencia medidas in vitro tales como la eritrofagocitosis y el efecto citopático (Ravdin y Guerrant, 1980; Orozco y col., 1980, 1983). Estas dos propiedades podrían utilizarse como una forma de diagnosticar la virulencia de cepas de E. histolytica y esta misma relación, se pudo apreciar en las mutantes obtenidas, ya que todas ellas fueron deficientes en fagocitosis y en efecto citopático y mostraron también ser menos virulentas que la clona parental, pues produjeron abscesos en una menor proporción de animales inoculados y fueron, además, más pequeños.

De todo esto, podemos concluir que la fagocitosis es necesaria para que se exprese la citopatogenicidad de las cepas amibianas, tanto in vivo como in vitro.

De acuerdo a las características fenotípicas de las mutantes obtenidas durante el desarrollo de esta tesis, las podemos agrupar en 2 grupos. Sin embargo, éstas presentan 4 características en común: deficiencia en fagocitosis,

adhesión, citopatía y virulencia y estas clonas solo difieren en su "actividad de toxina"; de acuerdo a esto, se construyó la siguiente tabla:

CLONA	FAG	ADH	CYP	TOX	VIR
A	+	+	+	+	+
T-1-1, T32, 731, 7-51	-	-	-	+	-
T-52, T-71, T-81, T-82					
T-42, T-43, T-63.	-	-	-	-	-

CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que:

- 1) Se establecieron las condiciones óptimas para la mutagénesis de Trofozoítos de E. histolytica con el compuesto químico ICR-170.
- 2) El agente mutagénico ICR-170 mostró en este sistema un fenómeno de saturación y disminución de la frecuencia de aparición de mutaciones, ya que, a concentraciones mayores de 15 y 20 ug/ml el incremento de la frecuencia de la mutación es poco significativa.
- 3) La frecuencia de mutación obtenida con el mutageno ICR-170, fue de 6.2×10^{-6} .
- 4) La clona A resultó ser una clona altamente homogénea, ya que sólo con la ayuda de un mutageno se pudieron aislar mutantes deficientes en fagocitosis.
- 5) La fagocitosis parece ser el evento más importante para que se exprese la agresividad del parásito, ya que todas las mutantes deficientes en fagocitosis resultaron ser avirulentas.
- 6) El efecto citopático sobre monocapas celulares de la línea MDCK está directamente relacionado con la

virulencia, ya que todas las clonas deficientes en fagocitosis, fueron incapaces de destruir esta monocapa.

- 7) La virulencia in vivo de los trofozoítos correlaciona ($r=0.9705$) directamente, tanto con la fagocitosis como con el efecto citopático medido in vitro. Por lo que conociendo los valores de estas dos propiedades, es posible predecir la virulencia de las cepas amibianas.
- 8) No se observó relación entre el efecto citotóxico con la virulencia de las clonas obtenidas, por lo que se sugiere que la expresión de esta propiedad no es suficiente para que se manifieste la virulencia amibiana.

BIBLIOGRAFIA.

- Albach, R. A.; Booden, T.; Boon Layanger, P. y Dowing, S. (1980). Concepts of function of peripheral non-cromatin and endosome in E. histolytica. Archivos de Investigación Médica (México), 11, Supl. (1): 63.
- Ames, B. y Whitfiel, H. (1966). Frameshift mutagénesis in Salmonella. Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol. 31 221.
- Ames, N.; Grover, P. L. (1972). Epoxides of carcinogenic polycyclic hidrocarbons are frameshift mutagens. Science, 176: 47.
- Appel and Zanker (1962). Z. Naturforsch., 13b, 126.
- Armstrong, A. J. (1956). Investigation of tissue fluorescence induced by acridine orange. J. Anat. London. 90: 598.
- Barker, D. C. y Swales, L. S. (1972). Characteristics of ribosomes during diferentiation from trophozoites to cyst in axenic Entamoeba sp. Cell Differ. 1: 297.
- Barnes, D. R. (1977). Zoología de los invertebrados, 3a. edición, Interamericana, México, 826.
- Bos, H. J. y Van de Griend, R. J. (1977). Virulence and toxicity of axenic E. histolytica. Nature. 265: 341.

- Bos, H. J. y Van de Griend, R. J. (1978). Symposium on the virulence of E. histolytica: c) variable toxicity within the HK-9 strain of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 9 (Supl. 1): 167.
- Bos, H. J. y Van der Eijk, A. (1980). Serum-inhibited toxicity of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) in (Supl.): 135.
- Bracha, R; Kobíler, D. y Mirelman, D.(1982). Attachment and ingestion of bacterial by trophozoites of Entamoeba histolytica. Inf. Inn. 36: 369.
- Bracha y, R.; y Mirelman, D. (1984). Virulence of Entamoeba histolytica trophozoites. Effects of bacteria, microaerobics conditions, and metronidazole. J. Exp. Med. 160: 353.
- Clarke, M. (1978). A selection method for isolating motility mutants of Dictyostelium discoideum. Cell Reproduction. Academic Press, New York: 621.
- Creech, J. H.; Preston, K.R.; Peck, M.R.; O'Connell, R.A. and Ames, N. B. (1972). Antitumor and mutagenic properties of a variety of heterocyclic nitrogen and sulfur mustards. Journal of Medicinal Chemistry. 15: 739.
- Crick, C. H. F., (1966). The genetic code II. Reading from Scientific American: The molecular basis soft life

an introduction to molecular biology. 6. 368.

- Chávez, A. y Segura, M. (1974). Interacción entre los trofozoítos de Entamoeba histolytica y los leucocitos de varias especies animales. Arch. Invest. Med. (Méx.). 5 (Supl. 2): 373.
- Charoelap, P.; Reyes, R. E. y Warren, L. G. (1968). Carbohydrates utilization by Entamoeba histolytica. Exp. Parasit. 23: 205.
- Chevez, A.; Iturbe-Alessio, J.; Segura, M. y Corona, D. (1972). Fagocitosis de eritrocitos humanos por Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.), 3 Supl. (2): 275.
- Chevez, A.; Segura, M.; Corona, E. e Iturbe-Alessio, I. (1972). Esférulas yuxtenucleares de Entamoeba histolytica. Estudio morfológico y dinámico. Arch. Invest. Med. (Méx.) 3. (Supl. 2): 257.
- Diamond, L. S.; Harlow, D. R. y Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 431.
- Domínguez, J. (1985). Estudio de antígenos de superficie durante el ciclo celular de Entamoeba histolytica en clonas de diferente virulencia. Tesis de licenciatura en

Biología. ENEP-Iztacala. UNAM.

- Drake, J. W. (1970). The molecular basis of mutation, Holden-day, San Francisco: 450p.
- Eagle, (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science 130: 432.
- Eaton, R. D.; Merovitch, E. y Costerton, J. W. (1970). The functional morphology of pathogenicity of E. histolytica. An Trop. Med. Parasitology 64: 229.
- Entner, N. (1961). Genetics of Entamoeba histolytica: Initial experiments. J. Protozool. 8 (2): 131.
- Entner, N. E. y González, C. (1962). Genetics of Entamoeba histolytica. Differences in drug sensitivity between Laredo and other strains of Entamoeba histolytica J. Protozool. 9 (4): 466.
- Freese, E. y Strck, H. B. (1962). Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 48: 1796.
- García-Rivera, G.; Guarneros, G.; Martínez-Palomo, A. (1982). Aislamiento de clonas deficientes en adhesión a eritrocitos humanos. Arch. Invest. Med. (Méx.) 13 (Supl. 3): 129.
- Gillin, D. F. y Diamond, S. L. (1978). Clonal growth

of Entamoeba in agar: some applications of this technique to study of their cell biology. Arch. Invest.Med.(Méx.) 9 (Supl. 1): 237.

- Gillin, F. D. y Diamond, L. S. (1978). Clonal growth of Entamoeba histolytica and other species of Entamoeba in agar. J. Prot. 255 (4): 539.
- Gillin, F. D. y Diamond, L. S. (1980). Attachment of Entamoeba histolytica to glass in a defined maintenance medium: Specific requirement for cysteine and ascorbic acid. J. Proto. 27 (4): 474.
- Grollman, A. P., and Jorkowsky, J. (1975). Emetine and related alkaloids in mechanism of action of antimicrobial and antitumoral agents. Antibiotics III. Corcoran, J.M. and Honh, F. E., eds Springer Yerling, N. Y. 420.
- Guerrant, L. P. (1986). The global problem of amebiasis: Current status research needs, and opportunities for progress. Reviews of interactions disease 8: 218.
- Gupta, R. S. y Siminovitch, L. (1977). The molecular basis of emetine resistance in Chinese Hamster Ovary Cells: Alteration in the 40 S ribosomal subunit. Cell 10: 61.
- Hernández, F. C. (1985). Intercambio genético en E.

histolytica. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Genética). Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

- Herriot, M. R. (1971). Effects on DNA transforming principle in Hollander. Chemicals Mutagens Principles and Methods for their detection. 1: 175.
- Hoeijmakers, J. H. J.; Fresch, A. C. C.; Bernards, A.; Burst, P. y Cross, G. A. M. (1980). Novel expression-linked copies of the genes for variant surface antigens in trypanosomes. Nature. 248: 78.
- Imperativo, P. J. (1981). A historical overview of amebiasis. Bul. N. Y. Acad. Med. 57: 175.
- Jarumilinta, R.; Kraddfer, F. (1964). The toxic effect of Entamoeba histolytica on leukocytes. Ann Trop. Med. Parasitol. 58: 375.
- Jooyner, L. D. y Norton, C. C. (1975). Transferred drug resistance in Eimeria maxima. Parasitology. 71: 385.
- Knight, R.; Bird, R. G.; y Mc Caul, T. F. (1975). Fine structural changes of Entamoeba histolytica rabbit kidney cell (RK13). Interface Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 69: 197.

- Kobiler, D. y Mirelman, D. (1981). Adhesion of Entamoeba histolytica trophozoites to monolayers of human cells. J. Infect. Dis. 144: 539.
- Kriég, (1954). *Experientia*, 10. 172.
- Lenhinger, L.A. (1982). *Bioquímica*, 2a. edición, Omega, Barcelona, p. 1117.
- Lerman, L. S. (1961). Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. J. Mol. Biol. 3: 18.
- López-Revilla, R. y Said-Fernández, S. (1980). Cytopathogenicity of E. histolytica: hemolytic activity of trophozoite homogenates. Am. J. Trop. Med. Hys. 29 (2): 209.
- Lushbaugh, W.B.; Nairella, A.B.; Cantey, J.R.; Hofbauer, A.F.; Pittman, J.C. y Pittman, F.E. (1978). Citotoxicity of a cell free extract of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27 298.
- Lushbaugh y col., (1979). Isolation of a cytotoxin, enterotoxin from Entamoeba histolytica J. Inf. Dis. 139: 9.
- Martínez-Palomo, A.; Tanimoto-Weki, M. y Tenā-Betancourt. (1980a). Evolución de las lesiones producidas en hamsters

- por inoculación de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11. (Supl. 1): 169.
- Martínez-Palomo, A.; Orozco, E. y González-Robles, A. (1980b). Entamoeba histolytica: Topochemistry and dynamic of the cell surface. En: The host Invader interplay. Van den Bosche (Edit). Elsevier North Holland Biom. Press. Amsterdam. p. 55.
 - Martínez-Palomo, A. (1982). The biology of Entamoeba histolytica. Research studies press, Great-Britain pp. 161.
 - Martínez-Palomo, A.; González-Robles, A.; Chávez, B.; Orozco, E. y Fernández-Castillo, S. (1985). Structural basis of the cytolytic mechanisms of Entamoeba histolytica. J. Protozool. 32: 165.
 - Marrern, C.F.T.; Keister, D. B. y Natovitz, P.C. (1980). Entamoeba histolytica "toxin" fetuin neutralizable and lectin-like. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39: 26.
 - Meuth, M. y Arrand, J. E. (1982). Alterations of gene structure in ethyl methane sulfonate induce mutants of mammalians cells. Mol. Cell. Biol. 2: 1459.
 - Michelson, A. M. y Monny, C. (1966). Bioch. Acta 129: 460.

- Montalvo, F. E.; Reyes, R. E. y Warren, L. G. (1971). Aerobic and anaerobic metabolism in Entamoeba histolytica Exp. Parasit. 30: 249.
- Noble, E. R. y Nobre, G. A. (1976). The biology of animal parasites. 4 ed. Philadelphia. Leo and Feblger.
- Novikoff, A. B.; Novikoff, P. M.; Davis C. y Quintana, N. (1972). Studies in microperoxisomes II. A cytochemical methods for light and electron microscopy. J. Hystochem. Cytochem. 20: 1006.
- Olguín, T. (1984). Estudio comparativo de la fagocitosis en dos clonas de Entamoeba histolytica de diferente virulencia. Tesis para obtener el título de licenciatura en Biología ENEP-Iztacala. UNAM.
- O'Neill, P. J.; Fuscoe, J. C. y Hsio, W. A. (1978). Mutagenicity of heterocyclic Nitrogen Mustard (ICR compounds) in cultured mammalian cells. Cancer Res. 38: 506.
- Orozco, E.; Martínez-Palomo, A. y López-Revilla, R. (1978). Un modelo in vivo para el estudio cuantitativo de la virulencia de E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 257.
- Orozco, E.; Martínez-Palomo, A. y Guarneros, G. (1980).

Virulencia y propiedades de superficie de varias cepas axénicas de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.). 11 (Supl. 1): 153.

- Orozco, E. (1981). Virulencia y propiedades de superficie en Entamoeba histolytica. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular CINVESTAV-IPN.
- Orozco, E.; Martínez-Palomo, A.; González-Robles, A.; Guarneros, G. y Mora-Galindo, J. (1982). Las interacciones lectina-receptor median la adhesión de E. histolytica a células epiteliales. Relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. Arch. Invest. Med. (Méx.) 13 (Supl. 3): 159.
- Orozco, E.; Guarneros, G.; Martínez-Palomo, A. y Sánchez, T. (1983). Entamoeba histolytica: Phagocytosis as a virulence factor. J. Exp. Med. 158: 1511.
- Orozco, E.; Hernández, F. C. y Rodríguez, M. A. (1985). Isolation and characterization of Entamoeba histolytica mutants resistant to emetine. Molec. Biochem. Parasitol. 15: 49.
- Orozco, E.; Suárez, M.E. y Sánchez, T. (1985). Difference in adhesion, phagocytosis, and virulence of clone from Entamoeba histolytica, strain HMI:IMSS. Int.J.Parasitol. 15: 655.

- Peck, M. R.; Tan, K. T. y Peck, B. E. (1976). Pulmonary carcinogenesis by derivatives of polynuclear aromatic alkylating agents. *Cancer Res.* 36: 2423.
- Pfefferkon, L. C. y Pfefferkon, E. R. (1980). Toxoplasma gondii. Genetic recombination between drug resistant mutants. *Exp. Parasitol.* 50: 505.
- Ravdin, J. I.; Krof, B. Y. y Guerrant, R. L. (1980). Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. *J. Exp. Med.* 152: 377.
- Ravdin, J. I. y Guerrant, R. L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 68: 1305.
- Ravdin, J. I. (1986). Pathogenesis of disease caused by Entamoeba histolytica: studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* 8: 247.
- Reichenbercher, V. E. y Caskey, C. T. (1979). Emetine-resistant chinese hamster cells. *J. Biochem.* 254. (14): 6207.
- Reinertson, J. W. y Thompson, P. E. (1951). Experimental amebic hepatitis in hamsters, *Proc. Exp. Biol. Med.* 76: 518.

- Rodríguez, M. A. y Orozco, E. (1986). Isolation and characterization of phagocytosis and virulent-deficient mutants of Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 154: 27.
- Said-Fernández, S. y López-Revilla, R. (1983). Latency and heterogeneity of Entamoeba histolytica hemolysins. Z Parasiten Kunde. 69: 435.
- Schaudinn, F. (1903). Untersuchungen. Ueber die fatpflanzung eininger Rhizopoder. Arbarten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte. 19: 547.
- Schuster, H. (1961). The reaction of tobacco mosaic virus ribonucleic acid with hydroxylamine. J. Mol. Biol. 3: 447.
- Sharma, N. N.; Albach, R. A. y Schaffer, J. G. (1970). Cytochemical comparison of nucleoproteins and acid mucopolysacharide in axenic vs monoaxenic Entamoeba histolytica. Bacteriol. Proceedings. 20.
- Sleigh, A. M. (1979). Biología de los protozoarios. H. Blume ediciones. España. 399 pp.
- Smith, J. W.; Mc Quay, R. M.; Ash, L. R.; Melvin, D. M.; Orihel, T. C. y Thompson, J. H. (1979). Diagnostic medical parasitology intestinal protozoa. American Society of Clinical Pathologis. Education Products Division. U.S.A.

- Streinsinger, M. R. (1971). Effects on DNA transforming principle. En: Hollande A. Chemical mutagens principles and Methods for their detection 1: 175.
- Suárez, M. E. (1983). La fagocitosis como factor de virulencia en Entamoeba histolytica. Tesis para obtener el título de licenciado en Biología. ENEP Iztacala UNAM.
- Svhla, G. y Backer, D. S. (1961). Ultraviolet microscopy of Entamoeba invadens. J. Parasitol. 47: 557.
- Tessman, I.; Poddar, R. K. y Kumar, S. (1964). Identification of the altered bases in mutated single-stranded DNA: I. In vitro mutagenesis by hydroxylamine, ethil methane sulfonate and nitrous acid. J. Mol. Biol. 9: 352.
- Trissl, D.; Martínez-Palomo, A.; De la Torre, M. y De la Hoz, R. (1976). Estudio cuantitativo de la aglutinación selectiva de cepas patógenas de Entamoeba histolytica inducida por concavalina A. En conferencia internacional sobre amibiasis. Editores B. Sepúlveda y L. S. Diamond. IMSS. Méx. 261 p.
- Trissl, D.; Martínez-Palomo, A.; De la Torre, M.; De la Hoz, R. y Pérez de Suárez, E. (1978). Surface properties of Entamoeba histolytica: Increased rate of human erythrocytes in pathogenic strains. J.Exp.Med. 148: 1137.

- Valcovic, R. L. (1979). General aspects of comparative mutagenesis. En: Banbury report: Assessing chemicals mutagens the risk to human. Mc.Elheny K.V. y Abrahamson S. (editores). Cold Spring Harbor laboratory. Estados Unidos.
- Walsh, A.J.(1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Stimulation of the global magnitude of morbidity and motility. Rev. Infect. Dis. 8: 228.
- Weinbach, S. y Diamond, L.S.(1974). Entamoeba histolytica aerobic metabolism. Exp. Parasitol. 35. 232.
- Wittner, M. (1968). Growth characteristic of axenic strains of Entamoeba histolytica. Schaudin 1903. J. Protozool. 15. 403.

APENDICE

SOLUCION SALINA ISOTONICA (SS) 0.89%

- NaCl 8.9 gr

Para un litro de agua destilada.

SOLUCION DE ALSEVER.

- Dextrosa 20.50 gr

- Citrato de sodio 8.00 gr

- Acido cítrico 0.55 gr

- Cloruro de sodio 4.20 gr

pH 6.1 en un litro de agua bidestilada.

MEDIO MINIMO (Para amibas).

- Tris-HCl 6.056 gr

- KCl 0.890 gr

- $MgCl^2 \cdot 6H^2$ 1.626 gr

- NaCl 1.462 gr

- $CaCl^2$ 0.220 gr

- Acido ascórbico 1.760 gr

- Cisteína 0.780 gr

pH 7 en 1 litro de agua bidestilada.

Medio de crecimiento (Para bacterias).