



**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES**

IZTACALA - U.N.A.M.

BO141/83
Ep.1

B i o l o g í a

**LA FAGOCITOSIS COMO FACTOR DE VIRULENCIA EN
"ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS"**

T E S I S

MARIA ELENA SUAREZ ZAVALTA

México, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

"LA FAGOCITOSIS COMO FACTOR DE VIRULENCIA EN
ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS"

por

MARIA ELENA SUAREZ ZAVALA

Tesis para obtener el grado de Licenciatura en la Carrera de
Biología

México, D. F.

1983

La realización del trabajo de Tesis para la obtención del grado de Licenciatura en Biología fué apoyado económicamente por la empresa AVON.

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

"LA FAGOCITOSIS COMO FACTOR DE VIRULENCIA EN ENTAMOEB HISTOLYTICA"

A mis padres quienes con su cariño y ayuda me impulsaron a llegar hasta el final.

Con cariño a mis hijos: Vivian e Ivan, ya que ellos fueron el incentivo más grande de mi carrera.

Y muy especialmente a mi compañero de ahora y siempre; mi esposo Jesus.

I N D I C E

Lista de Figuras.....	v
Lista de Tablas	v
Abreviaturas.....	vii
Agradecimientos.....	viii
I. <u>Resumén</u>	
1. Adhesión.....	2
2. Eritrofagocitosis.....	2
3. Virulencia.....	3
II. <u>Introducción y Antecedentes</u>	
1. Clasificación taxonómica de <u>E.</u>	
<u>histolytica</u>	4
2. Ciclo de vida de <u>E. histolytica</u>	7
3. Características del quiste y del.....	
trofozoíto de <u>E. histolytica</u>	
a) Quiste.....	8
b) Trofozoíto.....	
4. Importancia del estudio de <u>E.</u>	
<u>histolytica</u>	9
a) Como el parásito responsable de.....	
la amibiasis.....	9
b) Como un parásito con amplia dis-.....	
tribución geográfica.....	10
5. Cultivo de <u>E. histolytica</u> : Cepas y	
clonas.....	11

6. Virulencia de <u>E. histolytica</u>	13
7. Adhesión.....	14
8. Eritrofagocitosis.....	15
III. <u>Objetivos.</u>	
IV. <u>Materiales y Métodos.</u>	
1. Mantenimiento de las cepas.....	
ambianas.....	18
2. Crecimiento de las amibas en.....	
medio semisólido.....	18
3. Cultivo de Bacterias.....	19
4. Aislamiento de poblaciones ami-.....	
bianas deficientes en fagocito-.....	
sis.....	20
5. Eritrofagocitosis.....	22
6. Adhesión.....	23
7. Virulencia.....	24
V. <u>Resultados</u>	
1. Cultivo de bacterias.....	25
2. Selección de trofozoítos deficien.....	
tes en fagocitosis.....	27
3. Sensibilidad de los trofozoitos de	
la cepa HM1:IMSS y de la clona A al	
tratamiento de selección.....	30
4. Efecto de una segunda irradiación.....	
sobre los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS.....	32

5. Efecto de la tercera irradiación.....	
sobre los trofozoítos de la cepa	
HM1:IMSS.....	32
6. Crecimiento en medio semisólido.....	34
7. Eritrofagocitosis.....	36
8. Porcentaje de células no fagocíticas.....	40
9. Adhesión.....	40
10. Virulencia.....	48
VI. <u>Discusión.</u>	
1. Algunos factores de virulencia de	
las cepas amibianas.....	53
2. Métodos de selección de trofozoítos.....	
deficientes en fagocitosis.....	54
3. Eficiencia del método de aislamiento.....	57
4. BrdUr como agente mutagénico.....	58
5. Crecimiento en medio semisólido.....	59
6. Eritrofagocitosis y adhesión.....	59
7. Eritrofagocitosis y virulencia.....	65
8. Paquete estadístico.....	68
VII. <u>Conclusiones.</u>	
VIII. <u>Referencias.</u>	
IX. <u>Apendice, Medios y Técnicas.</u>	
Medio 56 (Mínimo)	
Medio Mínimo	
Medio TY1-S-33	

Solución de Alsever

Solución salina amortiguadora de
fosfatos (PBS)

Tinción de Novikoff.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. **Morfología de las bacterias**
- Figura 2. Estrategia para la obtención de amibas deficientes en fagocitosis.
- Figura 3. Primera irradiación de amibas alimentadas con bacterias E. coli CR34-Thy⁻.
- Figura 4. Segunda irradiación de amibas alimentadas con bacterias E. coli CR34-Thy⁻.
- Figura 5. Tercera irradiación de amibas alimentadas con bacterias E. coli CR34-Thy⁻.
- Figura 6. Caracterización de los abscesos hepáticos amibianos en hámsters jóvenes.

LISTA DE TABLAS

- Tabla I Crecimiento de las bacterias.
- Tabla II Crecimiento de E. histolytica en agar semisólido.
- Tabla III Fagocitosis de las clonas obtenidas a partir del primer tratamiento.
- Tabla IV Fagocitosis de las clonas obtenidas a partir del segundo tratamiento.
- Tabla V Fagocitosis de las clonas obtenidas a partir del tercer tratamiento.

Tabla VI	Porcentaje de células fagocíticas.
Tabla VII	Adhesión de los trofozoítos de las clonas obtenidas a partir del primer tratamiento.
Tabla VIII	Adhesión de los trofozoítos de las clonas obtenidas a partir del segundo tratamiento.
Tabla IX	Adhesión de los trofozoítos de las clonas obtenidas a partir del tercer tratamiento.
Tabla X	Virulencia de las clonas deficientes en fagocitosis.
Tabla XI	Clonas deficientes en adhesión.
Tabla XII	Clonas deficientes en ingestión
Tabla XIII	Eritrofagocitosis, Adhesión y virulencia de la clonas seleccionadas.
Tabla XIV	Paquete Estadístico SPSS.

ABREVIATURAS

A-B-Tim.....	Amibas con bacterias crecidas con timidina.
A-B-BrdUr.....	Amibas con bacterias crecidas en BrdUr
Adh ⁻	Amibas deficientes en adhesión.
B-BrdUr.....	Bacterias <u>E. coli</u> cepa CR34-Thy ⁻ crecidas en medio con 5-bromodeoxi-Uridina.
B-Tim	Bacterias <u>E. coli</u> cepa CR34-Thy ⁻ crecidas en medio con timidina.
BrdUr	5-Bromodeoxiuridina.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
<u>E. coli</u>	<u>Escherichia coli</u>
<u>E. histolytica</u>	<u>Entamoeba histolytica</u> .
EFC	Eficiencia de formación de colonias
HA	Hámsters con absceso.
HI	Hámsters inoculados.
Ing ⁻	Amibas deficientes en ingestión de eritrocitos.
MM	Medio Mínimo.
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos pH = 7,3
Tim.....	Timidina.
Thy	Timina
TY1-S-33	Medio de Diamond y col.(1978) para amibas
UK	Unidades Klett.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Marfa Esther Orozco Orozco, por la dirección de esta Tesis, por sus consejos y apoyo durante el trabajo de investigación y redacción.
- Al Dr. Gabriel Guarneros Peña por su interés y valiosas sugerencias durante la realización de este trabajo.
- Al Q. B.P. Tomás Sánchez Maldonado por su auxilio en los experimentos de determinación de la virulencia.
- A la Bióloga Guillermina García Rivera en quien encuentre una excelente compañera, quien me brindo ayuda técnica y científica, con su mayor disposición.
- Al Biólogo Fidel de la Cruz Hernández H. por sus comentarios y apoyo durante el desarrollo de esta tesis.
- Al Sr. Fernando Medina Ramírez porque con su amable ayuda facilitó la realización de este trabajo.
- Al Sr. Catarino Villeda por su trabajo de dibujo.
- Al P. de B. Arturo Ponce por su auxilio en las técnicas de estadísticas.
- A la Sra. Rosa María Cruces A. por su colaboración y amabilidad durante la transcripción de este manuscrito.
- A mis suegros Juan y Maria de Jesus, por su apoyo durante la elaboración de esta tesis.

RESUMEN

El objeto de este trabajo fue el estudio de la relación que existe entre la adhesión, la fagocitosis y la virulencia de las cepas amebianas.

Para la realización de este objetivo se aislaron varias clonas deficientes en adhesión y fagocitosis, utilizando la técnica descrita por Clarke (1978) para mutantes de motilidad de Dictyostelium discoideum y modificada por Orozco (1981) para obtener la clona L-6. La estrategia consistió en alimentar a los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS y de la clona A con bacterias E. coli cepa CR 34 crecidas en medio 56/2c suplementado con 5-bromodeoxiuridina. Las amebas que ingerieron suficientes bacterias, incorporaron la BrdUr en su DNA, por lo que al ser irradiadas con luz de longitud de onda de 310 nm el DNA amebiano se rompió en donde la BrdUr se había incorporado (Jones y Dove, 1972), y los trofozoítos que ingerieron una gran cantidad de bacterias murieron. La subpoblación sobreviviente a este tratamiento, se trató del mismo modo por dos veces más.

A partir de cada una de las subpoblaciones, sobrevivientes de cada tratamiento se obtuvieron varias clonas. La obtención de estas clonas se llevó a cabo por crecimiento en medio semisólido (Gillin y Diamond, 1978). La clonación se hizo con el fin de obtener poblaciones homogéneas. A partir del primer tratamiento se obtuvieron 18 clonas, del segundo 10 clonas y del tercero 7 clonas. A estas clonas se les probó su adhesión, eritrofagocitosis y virulencia.

1.- Adhesión.

Los ensayos de adhesión de las clonas se realizaron mediante la técnica descrita por García-Rivera y col., (1982) en la cual la suspensión de amibas (1×10^6 /ml) se incubó con la suspensión de eritrocitos (1×10^8 /ml) en un baño de agua hielo (0°C), por 5 min. A esta temperatura sólo se lleva a cabo la adhesión y no hay fagocitosis. Posteriormente se fijó la preparación y se contrastó con diaminobenzidina (Novikoff y col., 1972). Posteriormente se contaron los eritrocitos adheridos por amiba en 100 amibas y se obtuvo el promedio para cada una de las clonas. A partir de los tres tratamientos se obtuvieron 8 clonas deficientes en adhesión, arbitrariamente se definió, que clonas deficientes en adhesión, eran aquellas que presentaban un promedio de eritrocitos adheridos menos que el 50% de la cepa silvestre.

2.- Eritrofagocitosis.

La eritrofagocitosis se ensayó mediante la técnica descrita por Trissl y col., (1978), que consiste en incubar la suspensión de amibas (1×10^6 /ml) con la suspensión de eritrocitos (1×10^8 /ml) en un baño de agua a 37°C por 5 min. Al término del tiempo preestablecido se agregó agua bidestilada para lisar los eritrocitos no fagocitados y se fijó la preparación con glutaraldehído, posteriormente se contrastaron los eritrocitos con diaminobenzidina (Novikoff y col., 1972) y por último se contaron los eritrocitos fagocitados por amiba en 100 amibas al azar para obtener el promedio de eritrocitos por trofozoíto para cada clona. De las clonas obtenidas de los tres tratamientos, 15 de ellas

fueron deficientes en fagocitosis, con un porcentaje menor del 50% que la cepa silvestre.

3.- Virulencia.

La virulencia se midió in vivo en hámsters machos de aproximadamente 100 g de peso, a los cuales se les inocularon intraportalmente 250,000 trofozoítos, por hámster, para cada una de las clonas deficientes. A los siete días post-inoculación se sacrificaron los animales y se les revisó el hígado.

La virulencia para las clonas deficientes en fagocitosis y en adhesión, fue en todos los casos menor que el de la cepa silvestre, aunque se observó que para las clonas deficientes en fagocitosis el promedio de virulencia era menor, que el de las clonas con deficiencia en adhesión. De todas las clonas probadas para virulencia, una de ellas, obtenida de el tercer tratamiento, no fue virulenta. Las clonas deficientes en fagocitosis fueron también deficientes en virulencia, por lo que se sugiere que la fagocitosis es un factor importante en el mecanismo de agresión de la amiba.

INTRODUCCION

Entamoeba histolytica es el protozoario parásito del hombre responsable de la amibiasis.

1.- Clasificación taxonómica de E. histolytica.

La clasificación taxonómica de E. histolytica se describe a continuación y se desglosan las características más relevantes de los grupos a los que pertenece: (Kudo, 1976: Singh, 1975).

TAXONOMIA DE ENTAMOEBIA HISTOLYTICA

Phylum: Protozoo
 Subphylum: Plasmodroma
 Clase: Sarcodina
 Subclase: Rhizopoda
 Orden: Amoebida
 Familia: Endamoebidae
 Género: Entamoeba
 Especie: histolytica

El phylum protozoo se clasifica en dos subphylum: Plasmodroma y Ciliophora. Al subphylum Plasmodroma pertenecen aquellos protozoos que poseen de uno a varios núcleos de una misma clase.- La locomoción de -

estos protozoarios se lleva a cabo generalmente por medio de flagelos o pseudópodos, aunque la clase Sporozoa, perteneciente a este subphylum carece de órganos de locomoción.

El grupo de los plasmódios está subdividido en cuatro clases Mastigophora, Sarcodina, Sporozoa y Cnidosporidia. Algunas de estas clases presentan endoesqueleto ó exoesqueleto. La reproducción sexual es por singamia o automixis, la reproducción asexual es por escisión binaria o múltiple, por gemación o plasmotomía. La mayoría de los Mastigophoros y Sarcodinos son de vida libre, sin embargo llegan a encontrarse formas parásitas (Kudo, 1976).

Los miembros de la clase Sarcodina poseen una membrana externa comparativamente delgada y son capaces de formar pseudópodos, su citoplasma está generalmente diferenciado en ectoplasma y endoplasma. La mayoría son uninucleados, aunque entre los amebidos, foraminíferos y micetozoos se encuentran algunas formas multinucleadas. Las especies que viven en agua dulce presentan vacuolas contráctiles, pero éstas no se localizan en las formas parásitas o en aquellas que viven en agua de mar. El enquistamiento es otra característica común a la mayoría de los Sarcodarios, aunque en algunas especies no ha sido descrito (Singh, 1975).

La clase Sarcodina está subdividida en dos subclases: Rhizópoda y Actinopoda.

La subclase Rhizópoda está subdividida a su vez en cinco ordenes:
 a) Proteomyxida.- con pseudópodos radiales; b) Mycetozoida.- con rizopodos y formación de plasmódios; c) Amoebida.- con lobópodos y pseudópodos;

d) Testácida.- con testa de una sola cámara y e) Foraminífera.- con testa de una o más cámaras.

Los microorganismos pertenecientes a el orden Amoebida carecen de membrana exterior gruesa, o testa rodeando el cuerpo. Este orden está compuesto por cuatro familias:

Naegleriidae.- Estos organismos son amibas difásicas, es decir, presentan en su ciclo de vida una etapa ameboide y una etapa flagelada, siendo predominante la etapa ameboide. Estos organismos son en general de vida libre.

Paramoebidae.- En este orden se encuentran amibas parásitas y de vida libre. Una de sus características morfológicas es la presencia de dos núcleos.

Amoebidae.- Estos organismos se encuentran solo en fase ameboide, y viven como formas libres en agua dulce o salada.

Endamoebidae.- Esta familia está constituida por amibas parásitas que en su ciclo de vida presentan dos fases, la quística y la trofozoítica. Los trofozoítos son generalmente pequeños y viven en el canal alimenticio de varios animales huéspedes. El enquistamiento es un fenómeno común a esta familia y se multiplican por escisión binaria (Singh, 1975).

Los criterios que se han usado para establecer la división taxonómica en géneros y especies son: las características nucleares; las características de los trofozoítos y quistes; la especificidad en cuanto al huésped y la patogenicidad (Cervantes, 1980).

E. histolytica fue reconocida primeramente por Lösch en 1875, quién la encontró en heces humanas y úlceras colónicas (Singh, 1975). Posteriormente Dobell encontró en 1919 cuatro especies de amibas comensales; Entamoeba coli, Iodamoeba butschlii, Dientamoeba fragilis y Endolimax nana (Singh, 1975).

2.- Ciclo de vida de E. histolytica.

El ciclo de vida de E. histolytica es poco conocido, comparado con el de otros parásitos, puesto que no se han descrito con detalle sus estadios sexuales, y solo se sabe que este parásito presenta una fase trofozoítica y una quística. El trofozoíto es la forma invasiva y presenta movimiento mediante pseudópodos, además presenta actividad citotóxica y fagocítica. El trofozoíto se alimenta del contenido intestinal y se reproduce por fisión binaria. Bajo condiciones apropiadas, que hasta la fecha no están determinadas con exactitud pero que pueden ser la presencia de ciertos productos metabólicos, la presencia de ciertas bacterias, el amontonamiento o exceso de crecimiento, la desecación, la alcalinidad, la variación en el pH y la baja temperatura, entre otros, el trofozoíto se puede diferenciar en quiste, la forma infectante (Singh, 1975). Estos quistes pueden ser ingeridos con agua o alimentos contaminados. Después del paso de los quistes por el estómago y debido a los cambios en el pH y en otros factores, se inicia el desenquistamiento. Posteriormente se presentan diferentes estadios metaquísticos, hasta que el trofozoíto se desarrolla de nuevo en su habitat común, el colon (Cervantes, 1980).

3.- Características del quiste y del trofozoíto de E. histolytica.

a). Quiste.- La pared quística está estructurada por una malla fibrilar compacta, con un grosor de 125-150 nm (Chávez y col., 1978). Los quistes presentan de uno a cuatro núcleos dependiendo de su madurez. El tamaño del núcleo es de 4.23 μm , en promedio, en quistes mononucleados. Se ha observado también una vacuola de glucógeno, aunque en los estadios iniciales del enquistamiento son abundantes los agregados de glucógeno (Chávez y col., 1978). El quiste presenta también un endosoma pequeño, central o excéntrico. En el citoplasma se localizan cuerpos cromatoides de formas variadas en las que se observa la presencia de cromatina periférica.

b). Trofozoítos.- El trofozoíto mide en promedio 20 μm ; su núcleo mide en promedio de 3.5 a 6 μm ; su ectoplasma es hialino y abundante y se diferencia claramente del endoplasma, mientras que el endoplasma es finamente granular, y ligeramente vacuolado, sin mitocondrias, ni peroxisomas (Martínez-Palomo y col., 1976). Tampoco presenta aparato de Golgi, ni retículo endoplasmico (Cervantes, 1980). En trofozoítos invasores obtenidos directamente de pacientes con infección amibiana se encuentran inclusiones en el citoplasma, como eritrocitos y detritus celulares (Chevez y col., 1972). La cromatina periférica se observa en pequeños gránulos regulares distribuidos bajo la membrana nuclear, también presenta un endosoma pequeño y central.

Los trofozoítos de E. histolytica son muy activos y consecuentemente consumen grandes cantidades de energía. Tradicionalmente se les

ha considerado como anaerobios, dado que carecen de mitocondrias, citocromo y ciclo tricarboxílico funcional. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que son capaces de consumir oxígeno cuando se les proporciona (Weinbach y col., 1976). Las investigaciones del metabolismo aeróbico de E. histolytica han dilucidado que los sustratos que oxidan son: D-glucosa, D-galactosa, etanol, isopropanol, L-serina, piruvato, NADH y NADPH (Weinbach y col., 1978). En la cadena transportadora de electrones se han identificado varios nucleótidos, aunque aún se desconoce el último eslabón que transfiere los electrones al oxígeno, se supone que no es un citocromo pues este organismo carece de ellos.

Los trofozoítos de E. histolytica presentan producción explosiva de pseudópodos romos, su movilidad es direccional, progresiva y monopódica. Su temperatura de crecimiento fluctua entre 33°C y 39°C. Se cultiva axénicamente en el medio TY1-S-33 descrito por Diamond y col. (1978). Hasta ahora no se ha logrado producir enquistamiento en cultivos axénicos, sin embargo, se piensa que uno de los factores para el estímulo del enquistamiento es el aumento en la tasa de crecimiento (Singh, 1975).

4.- Importancia del estudio de E. histolytica.

La importancia del estudio de E. histolytica se puede enfocar desde dos puntos de vista:

a) Como el parásito responsable de la amibiasis. Este padecimiento varía desde la infección asintomática del colon hasta la disentería

amibiana aguda. En ocasiones se presenta también la invasión metastásica de diferentes órganos, siendo el absceso hepático amibiano la más común, aunque también puede invadir el pulmón, la piel y algunos otros órganos. El comienzo de la infección es gradual y varía ampliamente en intensidad, iniciándose con la colonización de la submucosa intestinal. Los factores responsables de la invasión del parásito no se conocen pero se ha propuesto que actividades enzimáticas tales como la actividad colagenolítica de E. histolytica, juegan un papel importante en el mecanismo de agresión de la amiba (Muñoz y col., 1982).

b) Como un parásito con amplia distribución geográfica. Actualmente se sabe que E. histolytica se localiza en regiones tropicales, subtropicales y templadas, aunque es más prevalente en regiones cálidas. Se asume además, que el 10% de la población del mundo padece de amibiasis asintomática y el 15% de ésta sufre de amibiasis sintomática (WHO, 1969). En países como México la incidencia de la amibiasis constituye un problema de salud nacional, ya que se ha estimado que el 6% de la población mexicana presenta reacción serológica positiva a los antígenos amibianos (Landa y col., 1972; Kagan, 1976; Gutiérrez y col., 1976).

La incidencia de la infección depende principalmente de las condiciones sanitarias de la comunidad. Los quistes, que son la fase infecciosa de este parásito, son evacuados por el huésped en las heces, a partir de donde pueden contaminar agua, vegetales y alimentos en general, también pueden ser transmitidos por medio de moscas, cucarachas y otros insectos. Otro factor importante de transmisión es la manipulación

inadecuada de los alimentos, ya que al manipularlos sin lavarse las manos se pueden transmitir los quistes.

5.- Cultivo de E. histolytica: Cepas y clones.

El estudio sistemático de E. histolytica ha presentado grandes dificultades, debido entre otras, a que hasta 1968 fué posible el cultivo axénico de los trofozoítos (Diamond, 1968).

En 1925 Boech y Drbohlav's empleando un medio descrito por ellos, realizaron los primeros cultivos de E. histolytica, aunque en asociación con distintos tipos de bacterias (Singh, 1975). Posteriormente Reardon y Jones en 1942 establecieron el primer cultivo monoaxénico de E. histolytica (Singh, 1975). Hasta que finalmente en 1968 Diamond describió el medio apropiado para cultivar los trofozoítos de E. histolytica axénicamente en medio TP-S-1. Posteriormente modificó este medio a TY1-S-33 (ver apéndice) (Diamond y col., 1978), que es el que utilizan actualmente la mayoría de los grupos de investigación.

El cultivo de las cepas de E. histolytica se ha establecido en el laboratorio al aislar trofozoítos a partir de diferentes fuentes, como por ejemplo: de heces fecales, úlceras colónicas, abscesos hepáticos y algunas otras. Al aislar los trofozoítos primero se cultivan en un medio mixto de huevo-sangre, para permitir su adaptación al cultivo (Robinson, 1968; De la Torre y col., 1974). Posteriormente los trofozoítos se cultivan en combinación con una bacteria o con un flagelado, para eliminar del medio los microorganismos presentes pero sin provocar

un cambio brusco para los trofozoítos, a este medio de cultivo se le llama mono-axénico. Por último, se eliminan del medio los microorganismos en asociación y los trofozoítos son crecidos axenicamente con el medio de cultivo propuesto por Diamond y col., (1978).

En la siguiente tabla se presentan algunas cepas de E. histolytica y la fuente de la cual fueron obtenidas (Richard y col., 1966; De la Torre y col., 1974).

<u>CEPA</u>	<u>OBTENCION</u>
HM1:IMSS	Disentería amibiana
HM2:IMSS	Lesiones ulcerosas del colón
HM3:IMSS	Absceso hepático
100:NIH	Disentería amibiana
HK9	Disentería amibiana
LAREDO	Disentería amibiana

Desde su aislamiento estas y otras cepas han sido mantenidas en cultivo mono-axénico y axénico, por lo que es probable que la población amibiana que compone dichas cepas sea heterogénea.

Gillin y Diamond (1978) describieron un método para obtener colonias de trofozoítos de E. histolytica en agar semisólido. Con este método es posible obtener clonas amibianas provenientes de una sola célula. Una de las ventajas de aislar clonas, es que el trabajo experimental se puede realizar con poblaciones homogéneas, también se pueden seleccionar por medio de la clonación poblaciones con características

previamente determinadas.

6.- Virulencia de E. histolytica.

Los estudios realizados sobre la virulencia de las cepas amibianas han demostrado que estas presentan diferente grado de virulencia. La mayoría de los investigadores han determinado la virulencia de las cepas amibianas in vivo, por el daño que causan los trofozoítos cuando se inoculan en el hígado de hámster (Phillips, 1973; Lushbaugh y col., 1978). Se ha observado que en hámsters recién nacidos las lesiones hepáticas producidas por la inoculación son progresivas hasta finalizar con la muerte de los animales y que la sensibilidad tiende a disminuir con el aumento en la edad de los animales (Martínez-Palomo y col., 1980a).

Algunos autores proponen que el cultivo axénico por tiempo prolongado disminuye la virulencia de las cepas amibianas (Bos y Van de Griend, 1977; Wittner y Rosenbaum, 1970; Mattern y Keister, 1977), y que es posible restaurar la virulencia de las cepas mediante el pase de los trofozoítos a través del hígado de hámster (Lushbaugh y col., 1978).

Diamond y col., (1974) en sus estudios sobre la virulencia de algunas cepas de E. histolytica no encontraron ninguna relación entre el tiempo de cultivo axénico y la pérdida o aumento de virulencia en las cepas estudiadas. Orozco (1981) menciona también que no hay cambios claros en la virulencia de las cepas con relación al tiempo de cultivo axénico.

No se han encontrado diferencias morfológicas ni bioquímicas entre

las cepas de diferente virulencia, sin embargo, algunos autores han reportado que ciertas características de superficie, presentan correlación directa con la virulencia de las cepas. Una de estas características que correlaciona con la virulencia es el grado de eritrofagocitosis, ya que las cepas más virulentas presentan un mayor grado de eritrofagocitosis (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1980; Martínez-Palomo y col., 1980b). Otra característica de superficie que correlaciona directamente con la virulencia es la capacidad de los trofozoítos para destruir células en cultivo (López y Said-Fernández, 1980; Orozco y col., 1978, 1980). La adhesión a la célula blanco es otra característica de superficie importante, aunque no se ha encontrado correlación directa con la virulencia de las cepas amibianas (García-Rivera y col., 1982). 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 concanavalina A no correlaciona directamente con la virulencia (Orozco y col., 1980).

De las propiedades antes mencionadas, la adhesión y la eritrofagocitosis revisten especial interés en el estudio de los factores de virulencia de las cepas amibianas.

7.- Adhesión.

Ha sido demostrado que existen carbohidratos en la superficie de

los microorganismos patógenos involucrados en la adhesión específica a la célula blanco (Strauss y col., 1970; Robbins y col., 1980; Bracha y col., 1982).

En el caso de E. histolytica ha existido controversia en relación a si el contacto directo entre el trofozoíto y la célula blanco es necesario para que se lleve a cabo la destrucción celular; algunos autores mencionan que el contacto directo entre la amiba y la célula blanco es determinante para provocar daño celular (Jarumilinta y Kradolfer, 1964; Eaton y col., 1969, 1970; Knight, 1977; McCauld y Bird, 1977; Orozco, 1978). Sin embargo, otros autores mencionan que no es necesario el contacto directo entre la amiba y la célula huésped, ya que la amiba puede secretar enzimas tóxicas que destruyen a las células cuando se difunden a través del medio en que se encuentran, (Artigas y col., 1966; Chévez y Segura, 1974; Takeuchi y Phillips, 1975; Ravdin y col., 1980). Orozco (1978, 1981) ha descrito que la adhesión es el primero de los eventos de la agresión de la amiba a la célula blanco, aunque, la adhesión no es una propiedad exclusiva de las amibas patógenas.

8.- Eritrofagocitosis.

La actividad histolítica y la capacidad eritrofágica son dos fenómenos fundamentales en la naturaleza patógena de E. histolytica: la primera está probablemente relacionada con los procesos enzimáticos y la segunda con la ingestión y nutrición del microorganismo (Chévez y col., 1972).

E. histolytica muestra gran selectividad para la ingestión de eritrocitos humanos, aun cuando también incorpora eritrocitos de otras especies, fagocita, si existen, bacterias del medio de cultivo, e inclusive ingiere restos amibianos (Artigas y col., 1966; Chévez y col., 1972).

La eritrofagocitosis ha sido considerada tradicionalmente por varios autores como prueba para la identificación de E. histolytica (Wilcocks y Manson, 1972; Zaman, 1970). Sin embargo, estudios realizados por otros grupos de investigación (Pizzi, 1956; Shaffer y Ansfield, 1956; Rabinovitch y de Stefano, 1971; Trissl y col., 1978), han demostrado que otras especies amibianas diferentes de E. histolytica son capaces de ingerir eritrocitos.

Una estrategia adecuada para definir el papel que el grado de fagocitosis de las cepas amibianas juega en la virulencia, sería el aislamiento de mutantes deficientes en fagocitosis y el estudio de la virulencia de estas mutantes.

Orozco (1981) a partir de la cepa HM1:IMSS altamente fagocítica y virulenta aisló una clona amibiana deficiente en fagocitosis. Esta clona, L-6, resultó ser deficiente en virulencia. Sin embargo, una sola mutante deficiente en fagocitosis es insuficiente para establecer la relación de este proceso con la virulencia amibiana, por lo cual es necesario obtener un mayor número de mutantes de E. histolytica que presenten deficiencia en los procesos de fagocitosis y adhesión para caracterizar estos eventos y definir si realmente están involucrados en la virulencia amibiana.

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue la obtención de un grupo de mutantes deficientes en fagocitosis y adhesión a partir de la cepa HM1:IMSS y de la clona A, ambas altamente fagocíticas y virulentas.

Una vez obtenidas estas mutantes, se caracterizó:

- a) La relación de la fagocitosis con la virulencia de las cepas amibianas.
- b) La relación de la adhesión con la fagocitosis y con la virulencia amibiana.

MATERIALES Y METODOS

1.- Mantenimiento de las cepas amibianas.

Los trofozoitos de la cepa HM1:IMSS, de la clona A y de las clonas deficientes en adhesión y en fagocitosis, obtenidas en este trabajo, se cultivaron axénicamente a 37°C en el medio TY1-S-33 descrito por Diamond y col., (1978). El medio se suplementó con, 15% de suero bovino (Bio--fluids) inactivado a 56°C durante 30 minutos en baño María, mezcla de vitaminas (3%) y antibióticos, penicilina (100 U/ml) y estreptomina (0.71 µg/ml).

Los cultivos en fase logarítmica de crecimiento (1.1 a 2×10^5 amibas/ml) se incubaron en agua-hielo durante 5 a 10 min para despegar las células de las paredes del tubo. Los tubos se agitaron suavemente y se inocularon entre 0.01 a 0.2 ml de la suspensión amibiana en tubos de 16x125 mm con tapa de rosca, conteniendo 12 ml de medio TY1-S-33 suplementado con la mezcla de suero, vitaminas y antibióticos. Los tubos se incubaron a 37°C durante 72 a 96 hrs y se revisaron en un microscopio óptico invertido (Olimpus Tokio) y aquellos que se encontraban en fase logarítmica de crecimiento se utilizaron para la resiembra o para experimentación.

2.- Crecimiento de las amibas en medio semisólido.

Se prepararon botellas Falcon de 40 ml con 31 ml de medio TY1-S-33 suplementado con suero, vitaminas y antibióticos. Las botellas Falcon se

incubaron durante 30 min a 40°C en baño María. Posteriormente se agregaron 3.1 ml de agar (Difco) preparado al 5% (peso/peso) en medio TY1-S-33 para obtener una concentración final de agar en el medio de 0.48%. Las botellas se agitaron vigorosamente hasta tener una mezcla homogénea (Gillin y Diamond, 1978). Previamente al paso anterior, los trofozoitos en fase logarítmica de crecimiento se despegaron del tubo de cultivo en agua-hielo, la suspensión de trofozoitos se ajustó a 1 trofozoito/ μ l y se incubó a 0°C hasta el momento de inocularlos en agar semisólido. Previa homogenización de la suspensión celular con pipetas Pasteur, se sembraron los inóculos correspondientes que fueron entre 50 y 200 trofozoitos por botella. Las botellas inoculadas se agitaron para distribuir los trofozoitos homogéneamente en el medio de cultivo y se incubaron en agua-hielo por 10 min hasta que el agar solidificó. Posteriormente las botellas se incubaron a 37°C por 4 a 7 días hasta que las colonias fueran aparentes a simple vista para contarlas y poder determinar la eficiencia de formación de colonias (EFC) calculada como: (Gillin y Diamond, 1978):

$$EFC = \frac{\text{No. de colonias obtenidas}}{\text{No. de trofozoitos inoculados}} \times 100$$

3.- Cultivo de Bacterias.

Se utilizaron bacterias Escherichia coli cepa CR 34 Thy⁻. Las bacterias fueron estriadas con una asa de siembra en varias cajas con medio Luria, éstas se incubaron por 24 hrs a 37°C y se observaron para comprobar que la morfología de las colonias fuera de un sólo tipo. Las bac

terias posteriormente fueron sembradas en medio 56/2 suplementado con tiamina (Sigma), casaminoácidos libres de vitaminas (Difco) y glucosa (Merck), a este medio se le llamó Medio 56/2c. Con una asa de siembra se tomaron dos colonias de las que se crecieron en medio Luria, y se diluyeron en 1 ml de medio 56/2c. Por otra parte, se prepararon 3 tubos con tapa de aluminio, a uno de los cuales se le agregaron 10 ml de medio 56/2c más timidina (50 µg/ml, Sigma) y 0.1 ml de la suspensión de bacterias y por último un tubo que sirvió de blanco con medio 56/2c sin bacterias. Se incubaron en agitación a 37°C durante 24 hrs, posteriormente se observaron para comprobar que el único tubo con crecimiento fuera el que contenía timidina y bacterias.

Las bacterias se ajustaron a 1×10^8 /ml con medio mínimo (MM) (Gillín y Diamond, 1980) en un matraz nefelométrico, la densidad óptica se leyó en un fotocolorímetro Klett con filtro verde. Las bacterias se ajustaron con MM a 30 UK que equivalían, de acuerdo a una curva patrón previamente realizada, a una concentración de 1×10^8 bacteria/ml.

4.- Aislamiento de poblaciones amibianas deficientes en fagocitosis.

Para seleccionar trofozoítos deficientes en fagocitosis se adaptó la técnica utilizada por Clarke(1978), para obtener mutantes de motilidad de Dictyostelium discoideum. Las bacterias E. coli se sembraron en medio 56/2c suplementado con timidina (50 µg/ml). A las 24 hrs de incu

bación a 37°C las bacterias se lavaron y se sembraron en medio 56/2c, en el que la timidina se substituyó por bromodioxiuridina (50 µg/ml) (Sigma) (BrdUr). El crecimiento de las bacterias se llevó a cabo durante 4 hs en agitación, a 37°C. Las bacterias se lavaron 2 veces con medio 56/2 y se tomó una alícuota para ajustar a 1×10^8 bacterias/ml en el MM suplementado con estreptomycinina (0.71 µg/ml). Las bacterias crecidas con timidina se denominaron B-Tim y las crecidas con bromodioxiuridina B-BrdUr.

Por otra parte, las amibas en fase logarítmica de crecimiento, se lavaron una vez con MM, se ajustaron a 1×10^6 trofozoítos/ml en MM y se mezclaron 0.5 ml de la suspensión de amibas más 0.5 ml de la suspensión de bacterias, la mezcla celular se incubo 3 hrs a 37°C para permitir la fagocitosis de las bacterias por las amibas.

Las amibas se lavaron dos veces con MM suplementado con estreptomycinina (0.71 µg/ml) y se sembraron en 12 ml de medio TY1-S-33c. Se incubaron 24 hrs a 37°C, se lavaron nuevamente dos veces con MM y se re-suspendieron a 0.5×10^6 trofozoítos/ml en MM. 2 ml de esta suspensión se pasaron a cajas de Petri de 35 mm de diámetro las tapas de las cajas se invirtieron y se llenaron con solución de timidina (1 mg/ml) que funcionó como filtro de los rayos U V de longitud de onda menor de 310 nm. Las cajas se pusieron sobre hielo a una distancia aproximada de 4 cm, bajo una lámpara Westinghouse UV que emite luz de longitud de onda de 310 nm (Jones y Dove, 1972) y se irradiaron durante 2 hrs. Posteriormente las amibas se contaron, se lavaron y se sembraron en tubos

con medio TY1-S-33.

Los trofozoítos viables se contaron cada 24 hrs hasta que los cultivos estuvieron en fase logarítmica de crecimiento. Al llegar a este punto se repitió el protocolo de selección completo por dos veces más. Las poblaciones seleccionadas se clonaron en agar semisólido, se aislaron varias clonas y se midió la eritrofagocitosis, adhesión y virulencia.

5.- Eritrofagocitosis.

Los eritrocitos humanos se obtuvieron por punción venosa, en una jeringa con solución anticoagulante de Alsever (Garvey y col., 1977). Los eritrocitos se lavaron 3 veces con solución salina (NaCl 0.9%) y se resuspendieron en medio TY1-S-33 a una concentración de 1×10^8 eritrocitos/ml, para ser posteriormente utilizados. Los trofozoítos de las cepas HM1:IMSS, de la clona A de las clonas deficientes en fagocitosis y adhesión obtenidas en este trabajo, se desprendieron de los tubos por enfriamiento en agua-hielo y se ajustaron en el mismo medio de cultivo a 1×10^6 trofozoítos/ml. Los ensayos de fagocitosis se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Trissl y col., (1978). Los tubos con 0.2 ml de la suspensión de eritrocitos (1×10^8 /ml) y 0.2 ml de la suspensión de amibas (1×10^6 /ml) se incubaron en baño María a 37°C para permitir la fagocitosis. A los 5 min se sacaron los tubos del baño María y se les agregaron 10 ml de agua bidestilada para lisar los eritrocitos libres y adheridos a la superficie de los trofozoítos,

pero no ingeridos. Después de 10 min de incubación con agua bidestilada a temperatura ambiente, los tubos se centrifugaron por 2 min en una centrífuga clínica (IEC) a 360 x g. Las mezclas celulares se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.3 (PBS), durante 30 min a 37°C. Posteriormente las preparaciones se lavaron tres veces con solución salina (NaCl 0.9%) y por último las preparaciones se contrastaron con diaminobenzidina (Novikoff y col., 1972). Los eritrocitos ingeridos por amiba se contaron en 100 amibas al azar, con la ayuda de un microscopio Zeiss a un aumento de 160 x y se obtuvieron promedios para cada tiempo y cepa.

6.- Adhesión.

Los ensayos de adhesión se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por García-Rivera y col., (1982). Tubos con 0.2 ml de la suspensión de amibas (1×10^6 /ml) y 0.2 ml de la suspensión de eritrocitos humanos (1×10^8 /ml) se incubaron en un baño de agua-hielo para permitir la adhesión de los eritrocitos a las amibas. A los 5 min, las mezclas celulares se fijaron con glutaraldehído (2.5% en PBS) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, las preparaciones se lavaron tres veces con solución salina (NaCl 0.9%) y se contrastaron con diaminobenzidina (Novikoff y col., 1972). Los eritrocitos adheridos a la superficie amibiana se contaron en 100 amibas al azar con la ayuda de un microscopio Zeiss a un aumento final de 160 x y se obtuvieron promedios para cada cepa.

7.- Virulencia.

La virulencia de las clonas obtenidas en este trabajo se midió in vivo utilizando hámsters machos de aproximadamente 100 g de peso, en los que se inocularon trofozoítos de las clonas seleccionadas a partir de HM1:IMSS. En todos los casos se utilizó la clona A como control.

Los hámsters se pesaron, se anestesiaron con Anestésal (Norden Méx.) (1 ml por cada 100 g de peso, de una solución diluída en agua destilada, 1:10) y se fijaron a una base de madera, después se les rasuró el abdomen y se desinfectó con merthiolate, posteriormente se practicó laparatomía por medio de una incisión de aproximadamente 4 cm para localizar la vena porta en la cual se inyectaron 250,000 trofozoítos en 0.5 ml de medio TY1-S-33 sin suero, con una jeringa de 1 ml. Terminada la inoculación, se reacomodaron las víceras y se cerró la incisión en dos planos, el muscular y el de la piel. Ocho días después los hámsters se abrieron previa anestesia y se extrajo el hígado para revisar si había formación de abscesos hepáticos.

RESULTADOS

1.- Cultivos de bacterias.

El primer paso en los cultivos de bacterias E. coli cepa CR 34 Thy⁻ fue comprobar la pureza de los cultivos. Para ésto se verificó que las colonias crecidas en medio semisólido Luria-Agar presentaran morfología semejante. Se tomó una sola de las colonias del cepario, se propagó en medio líquido 56/2c y se resembró en Luria-agar semisólido. Una vez que se comprobó que el cultivo formaba colonias de morfología uniforme, se resembró una de las colonias en medio 56/2c, otra en medio 56/2c más Tim, otra con medio 56/2c sin Tim y otra más con medio 56/2c más BrdUr. Los cultivos de bacterias E. coli cepa CR 34 Thy⁻ sembrada en medio suplementado con Tim presentaron buen crecimiento; mientras que cuando el medio se suplementó con BrdUr el crecimiento fue menor. Sin embargo, las bacterias que fueron sembradas en medio sin Tim ni BrdUr no presentaron crecimiento (Tabla I). Estos resultados indicaron que los cultivos requieren de Tim en el medio para desarrollarse y que la BrdUr se incorpora en lugar de la Tim aunque con una menor eficiencia.

Por otra parte, la morfología de las bacterias crecidas en BrdUr se utilizó como indicador de que éstas incorporaron la BrdUr en su DNA. Al microscopio óptico las bacterias crecidas con BrdUr se observaron con morfología alargada en comparación con las bacterias crecidas

TABLA I

CRECIMIENTO DE E. COLI CEPA CR 34 TIM⁻

MEDIO	COMPLEMENTO	CRECIMIENTO
LURIA-AGAR	-----	+++++
56/2c	*TIMIDINA	+++++
56/2c	* BrdUr	+++
56/2c	-----	-----

en medio suplementado con Tim (Fig. 1).

2.- Selección de trofozoitos deficientes en fagocitosis.

El método de selección usado para el aislamiento de subpoblaciones deficientes en fagocitosis esta basado en el esquema descrito por Clarke (1978) para la obtención de mutantes de motilidad de Dictyostelium discoideum, sin embargo en nuestro sistema la mutagénesis no fué necesaria. El esquema esta basado en la sensibilidad que presentan las amibas a la irradiación con luz cercana a la visible, después de incorporar en su DNA la BrdUr que llevaban las bacterias que ingirieron (Fig. 2). Se aislaron, de una población altamente fagocítica y virulenta, E. histolytica (HM1:IMSS), varias clones deficientes en fagocitosis eliminando a traves de la irradiación a las amibas que ingirieron una gran cantidad de bacterias con BrdUr. En los ensayos de fagocitosis, adhesión y virulencias de las clones seleccionadas se utilizó como control la clona A, que fue obtenida sin tratamiento previo de selección por Orozco (1982).

Los trofozoitos de la clona A y de la cepa HM1:IMSS en fase logarítmica de crecimiento se incubaron con B-BrdUr y con B-Tim, durante 3 h a 37°C para permitir la ingestión de las bacterias por las amibas. Al término de las 3 h de incubación las amibas se lavaron para descartar las bacterias no ingeridas y los trofozoitos lavados se incubaron en medio TY1-S-33c durante 20 a 24 h para permitir la incorporación de la BrdUr en el DNA amibiano. Posteriormente los trofozoitos se irradiaron durante 2 h con luz U V de 310 nm, se sembraron en TY1-S-33c y se incubaron a 37°C.

FIGURA 1

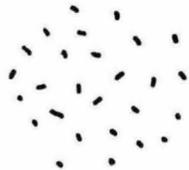
Morfología de E. coli cepa CR 34 Thy⁻

En el dibujo de la izquierda se muestra la morfología de las bacterias crecidas en medio 56/2c suplementado con timidina, esta observación se realizó en un microscopio Zeiss a 40 x.

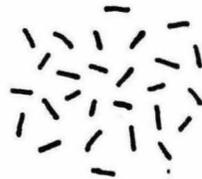
En el dibujo de la derecha se observa un esquema de las bacterias crecidas en medio 56/2c suplementado con BrdUr, observadas al microscopio a un aumento de 40 x. En el cual es evidente el alargamiento de las bacterias.

MORFOLOGIA DE E. coli CEPA CR34 Tim⁻

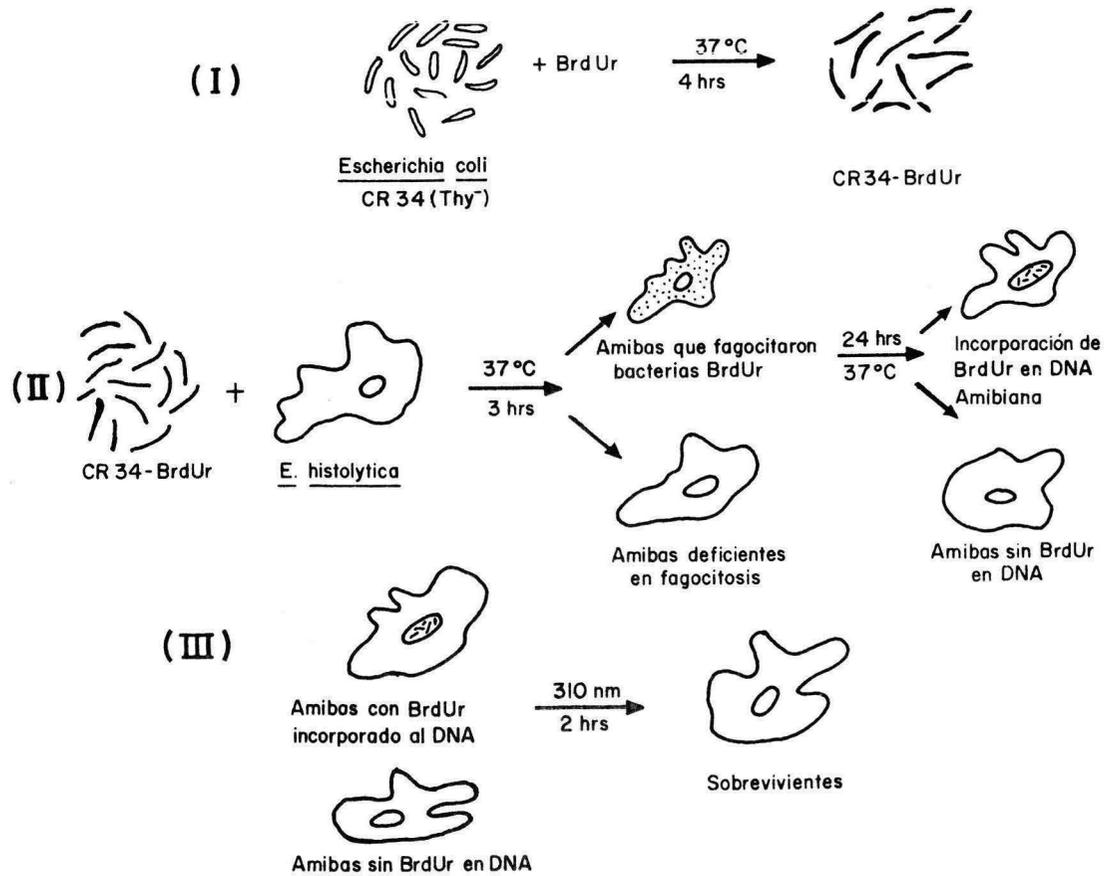
BACTERIAS CRECIDAS
CON Tim



BACTERIAS CRECIDAS
CON BrdUr



Esquema de la obtención de trofozoítos deficientes en fagocitosis
(Clarke; 1978).



Los trofozoitos viables se contaron a diferentes tiempos hasta que el cultivo llegó a fase logarítmica de crecimiento.

3.- Sensibilidad de los trofozoitos de la cepa HM1:IMSS y de la clona A al tratamiento de selección.

De acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo los trofozoitos más fagocíticos de la cepa HM1:IMSS, perecerían con el tratamiento de selección, debido a la incorporación de una gran cantidad de BrdU_r en el DNA amibiano, lo que provocaría la ruptura del mismo al ser irradiado con luz de longitud de onda de 310 nm. Esto a su vez causaría la muerte de los trofozoitos en el momento de la división celular.

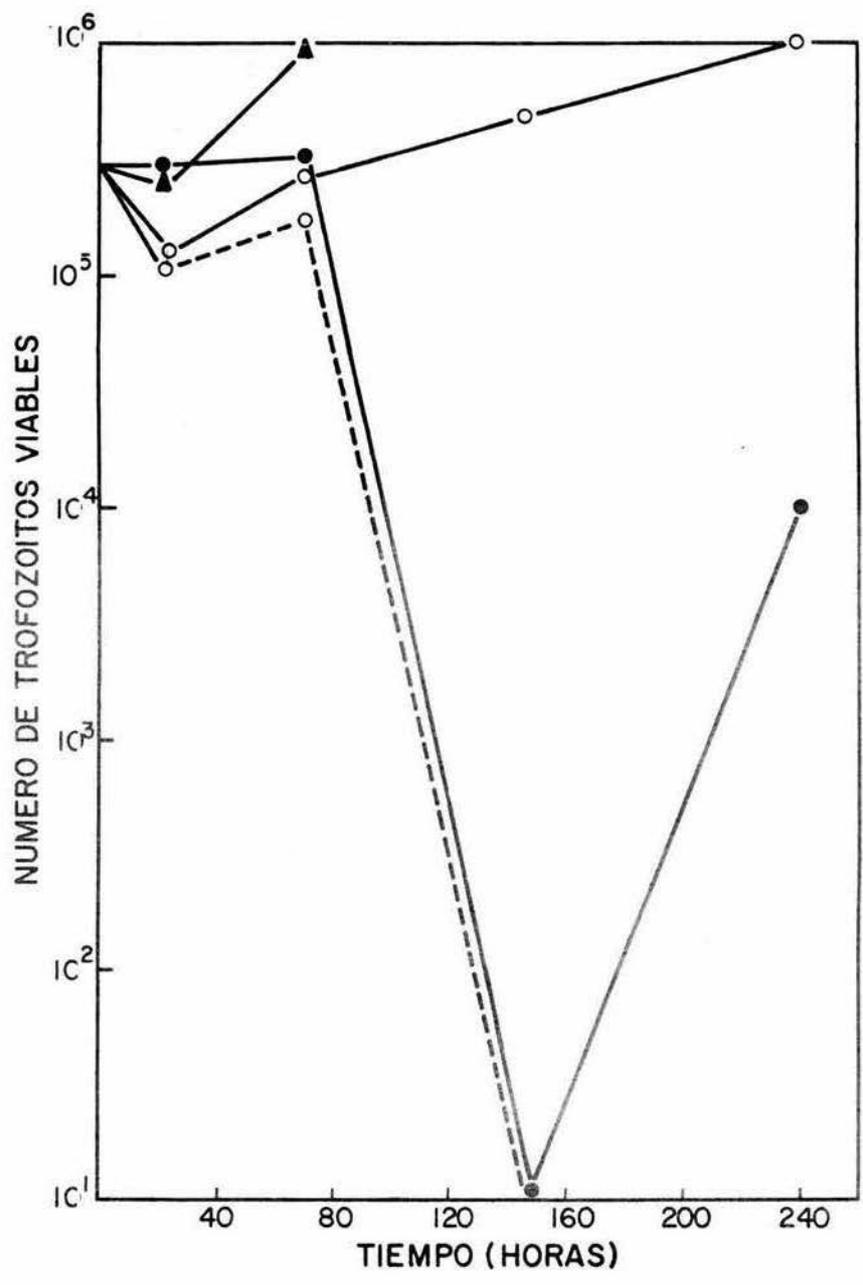
En la Fig. 3 se observa que mientras los trofozoitos de la cepa HM1:IMSS alimentados con B-Tim e irradiados con luz de 310 nm disminuyeron en menos de un orden de magnitud, los trofozoitos alimentados con B-BrdU_r e irradiados con luz de 310 nm disminuyeron aproximadamente cuatro ordenes de magnitud (HM1:IMSS). Por otra parte los trofozoitos de la clona A, alimentados con B-Tim y posteriormente irradiados, presentaron un crecimiento similar al de los trofozoitos HM1:IMSS alimentados con B-Tim, sin embargo, los trofozoitos de la clona A alimentados con B-BrdU_r e irradiados con luz de 310 nm fueron muriendo hasta que la población desapareció por completo. Esto sugiere que la totalidad de los trofozoitos de la clona A, utilizados para este experimento (0.5×10^6) fueron sensibles al tratamiento, mientras que un número pequeño de trofozoitos de la cepa HM1:IMSS fueron resistentes.

FIGURA 3

Primera irradiación de E. histolytica (HM1:IMSS y clona A) con luz UV
de 310 nm

Los trofozoítos de la clona A y de la cepa HM1:IMSS fueron divididos en dos lotes iguales. Uno de los lotes se incubó con B-BrdUr y el otro con B-Tim por 3 h a 37°C. 24 h después los trofozoítos se sometieron a irradiación con luz de 310 nm por 2 h y posteriormente fueron cultivados en medio TY1-S-33.

- o Trofozoítos de la clona A alimentados con B-Tim e irradiados con luz de 310 nm.
- ▲ Trofozoítos de la cepa HM1:IMSS alimentados con B-Tim e irradiados con luz de 310 nm.
- o Trofozoítos de la cepa HM1:IMSS alimentados con B-BrdUr e irradiados con luz de 310 nm.
- - - Trofozoítos de la clona A alimentados con B-BrdUr e irradiados con luz de 310 nm.



4.- Efecto de una segunda irradiación sobre los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS.

Los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS 1X que sobrevivieron al primer tratamiento de selección fueron crecidos hasta fase logarítmica, y posteriormente se sometieron a un segundo tratamiento. Los trofozoítos una vez alimentados con B-BrdUr e irradiados con luz de 310 nm presentaron mayor resistencia a la segunda irradiación, después de la incorporación de BrdUr, en comparación con la cepa silvestre HM1:IMSS.

En la Fig. 4 se muestran los resultados del segundo tratamiento, los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS incubados con B-Tim e irradiados con luz de 310 nm no presentaron disminución significativa en la población. Las curvas de crecimiento (Fig. 4) muestran que los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS 1X alimentados con B-BrdUr e irradiados con luz de 310 nm disminuyeron en aproximadamente 3.5 ordenes de magnitud (HM1:IMSS 2X). En esta segunda irradiación la población de la clona A alimentada con B-BrdUr y posteriormente irradiada desapareció por completo nuevamente.

5.- Efecto de la tercera irradiación sobre los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS.

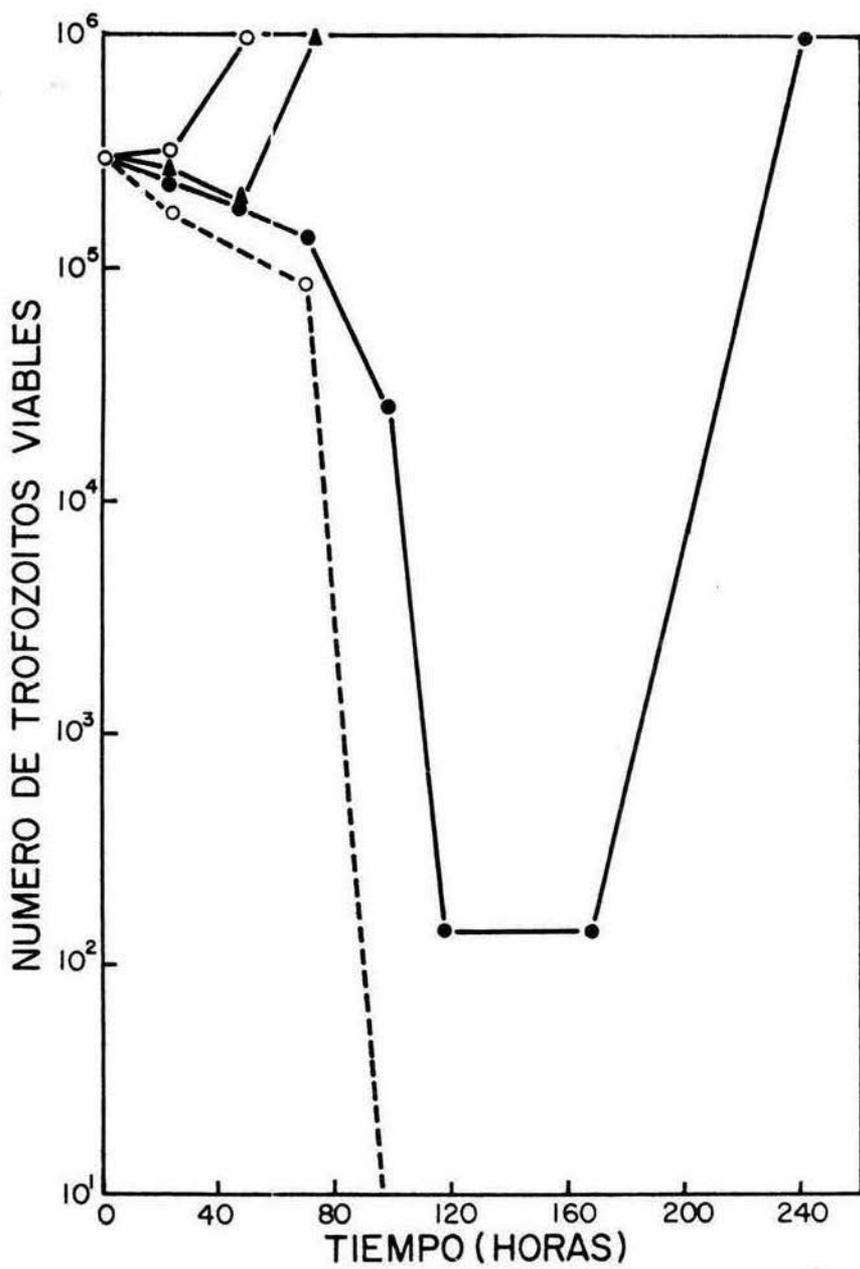
Los trofozoítos sobrevivientes del segundo tratamiento, (HM1:IMSS) se subcultivaron nuevamente hasta fase logarítmica de crecimiento y se repitió el protocolo de selección de interacción entre los trofozoítos

FIGURA 4

Segunda irradiación de E. histolytica (HM1:IMSS y clona A) con luz
UV de 310 nm

Los trofozoítos de la clona A y los trofozoítos sobrevivientes del primer tratamiento de la cepa HM1:IMSS fueron divididos en dos lotes iguales. Uno de los lotes se incubó con B-BrdU_r y el otro con B-Tim durante 3 h a 37°C. 24 h después los trofozoítos se sometieron a irradiación con luz de 310 nm por 2 h y posteriormente fueron cultivados en medio TY1-S-33.

- o Trofozoítos de la clona A alimentados con B-Tim e irradiados con luz de 310 nm.
- ▲ Trofozoítos de la cepa HM1:IMSS alimentados con B-Tim e irradiados con luz de 310 nm.
- o Trofozoítos de la cepa HM1:IMSS 1x alimentados con B-BrdU_r e irradiados con luz de 310 nm.
- - - Trofozoítos de la clona A alimentados con B-BrdU_r e irradiados con luz de 310 nm.



con B-Tim y B-BrdUr seguidas de la irradiación con luz UV de 310 nm.

En este último tratamiento los trofozoitos de la cepa HM1:IMSS 2X alimentados con B-BrdUr, presentaron una curva de crecimiento similar a la de los controles positivos que en este caso fueron los trofozoitos de la cepa HM1:IMSS y los de la clona A alimentados con B-Tim e irradiados con luz de 310 nm (Fig. 5). La muerte de la población tres veces tratada (HM1:IMSS 3X) fue menor a un orden de magnitud, por lo que podría decirse que la sensibilidad de esta subpoblación a la irradiación con luz de 310 nm, después de la incorporación de las B-BrdUr es semejante a la sensibilidad de los controles. La población de la clona A tratada con B-BrdUr, nuevamente desapareció totalmente después de la irradiación. Los trofozoitos sobrevivientes a este tratamiento (HM1:IMSS 3X) se subcultivaron en medio líquido TY1-S-33.

6.- Crecimiento en medio semisólido.

Se ha mencionado que existe una estrecha relación entre la patogenicidad de las cepas amibianas y la capacidad de estas para crecer en medio semisólido (Gillin y Diamond, 1978). Uno de los objetivos de este trabajo fue estudiar la relación que existe entre algunas propiedades de superficie de los trofozoitos, como la fagocitosis y la adhesión con la virulencia de las cepas amibianas. Por otra parte, para la obtención de poblaciones homogéneas con deficiencia en fagocitosis y/o adhesión fue necesario la clonación de las subpoblaciones seleccionadas a partir de la cepa silvestre HM1:IMSS.

FIGURA 5

Tercera irradiación de E. histolytica (HMI:IMSS y clona A) con luz UV
de 310 nm

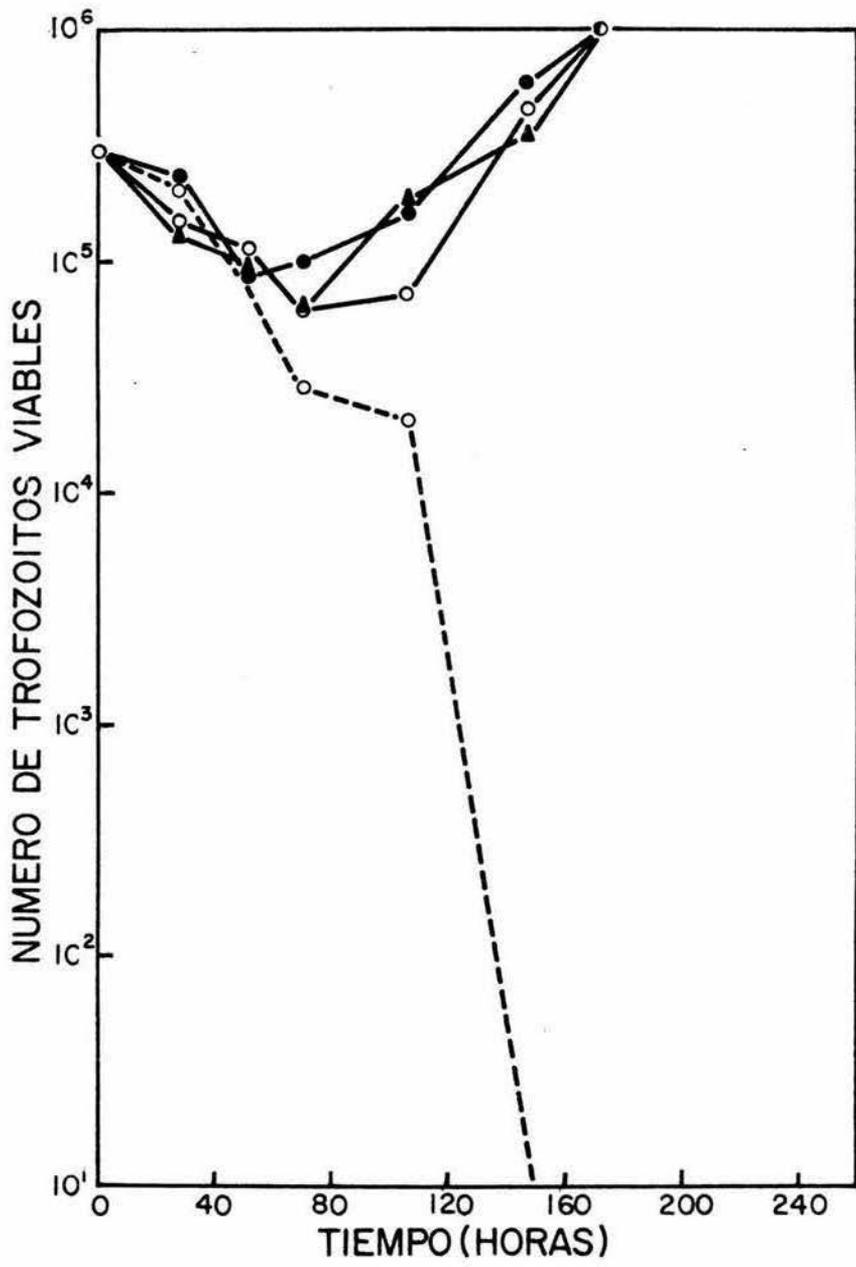
Los trofozoítos de la clona A y los trofozoítos sobrevivientes del segundo tratamiento de la cepa HMI:IMSS fueron divididos en dos lotes iguales. Uno de los lotes se incubó con B-BrdUr y el otro con B-Tim durante 3 h a 37°C. 24 h después los trofozoítos se sometieron a irradiación con luz de 310 nm por 2 h y posteriormente fueron cultivados en medio TY1-S-33.

- o Trofozoítos de la clona A alimentados con B-Tim e irradiados con luz de 310 nm.

- ▲ Trofozoítos de la cepa HMI:IMSS alimentados con B-Tim e irradiados con luz de 310 nm.

- o Trofozoítos de la cepa HMI:IMSS 2x alimentados con B-BrdUr e irradiados con luz de 310 nm.

- - - Trofozoítos de la clona A alimentados con B-BrdUr e irradiados con luz de 310 nm.



Los trofozoítos sobrevivientes del primer tratamiento en fase logarítmica fueron inoculados en medio TY1-S-33 - agar al 0.48% (Gillin y Diamond, 1978), para comprobar si estas poblaciones obtenidas de los distintos tratamientos eran capaces de crecer en medio semisólido y así aislar varias colonias para probar su fagocitosis y adhesión a eritrocitos humanos. A los siete días post-inoculación de los trofozoítos, las botellas Falcon con agar se revisaron y se contó el número de colonias visibles a simple vista para obtener la EFC. A partir de la población HM1:IMSS 1X se aislaron dieciocho colonias al azar, las cuales fueron subcultivadas en medio líquido TY1-S-33c hasta fase logarítmica y posteriormente crecidas para realizar los ensayos de adhesión, fagocitosis y virulencia. La EFC para la subpoblación obtenida a partir del primer tratamiento de selección HM1:IMSS 1X, fué de 49.7% como se observa en la Tabla II. Las poblaciones sobrevivientes de la segunda y tercera irradiación (HM1:IMSS 2X y HM1:IMSS 3X), mostraron una menor EFC en medio semisólido. Aparentemente, la capacidad de los trofozoítos para formar colonias en medio semisólido fue disminuyendo conforme aumentó el número de tratamientos. La EFC de las tres subpoblaciones fue menor que el de la cepa silvestre HM1:IMSS (Tabla II).

7.- Eritrofagocitosis.

La fagocitosis se ha considerado tradicionalmente como un parámetro para determinar la patogenicidad de las cepas amibianas (Chévez y col., 1972). Sin embargo, se ha demostrado que otras especies amibianas dife--

TABLA II

CRECIMIENTO EN AGAR SEMISOLIDO DE E. HISTOLYTICA (HM1:IMSS)

C E P A	E F C	No. DE EXPERIMENTOS *
HM1:IMSS	69.0 %	6
HM1:IMSS 1x	49.7 %	6
HM1:IMSS 2x	42.1 %	6
HM1:IMSS 3x	39.3 %	6

* Cada experimento se realizó por duplicado.

rentes a E. histolytica son capaces de ingerir eritrocitos (Pizzi, T., 1956; Shaffer, J. G., y Ansfield, J., 1956; Trissl y col., 1978) y que cepas de E. histolytica de baja virulencia también ingieren eritrocitos humanos aunque con menor eficiencia (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1980). El objeto de este trabajo fue presentar mayores evidencias de que el grado de eritrofagocitosis es un factor determinante en la virulencia de las cepas de E. histolytica.

Las clonas obtenidas de los diferentes tratamientos de selección fueron ensayadas para medir su grado de eritrofagocitosis con la técnica descrita por Trissl y col., (1978) como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Cada clona se ensayó cuando menos tres veces por duplicado y se obtuvieron promedios de eritrocitos/amiba, después de contar los eritrocitos ingeridos en 100 amibas. Se definió arbitrariamente que una clona era deficiente en fagocitosis cuando el número promedio de eritrocitos ingeridos por amiba, en cuando menos tres experimentos independientes, resultó ser el 50% o menos que el número promedio de eritrocitos ingeridos por los trofozoítos de la cepa silvestre HMI: IMSS.

En la Tabla III se observan los resultados de la eritrofagocitosis de las clonas obtenidas a partir de el primer tratamiento. En estos experimentos el 33% de las clonas aisladas fueron deficientes en eritrofagocitosis en comparación con la cepa silvestre, 33.3% mostraron un grado de fagocitosis intermedio entre las deficientes y la cepa silvestre y

TABLA III

ERITROFAGOCITOSIS DE LAS CLONAS AISLADAS A PARTIR DE HM1:IMSS 1x*

C L O N A	ERITROCITOS/AMIBA
HM1:IMSS	9.02
1	5.25
2	5.21
3	6.04
4	3.89
5	5.4
6	3.96
7	4.86
8	9.0
1'	9.04
2'	3.22
3'	3.56
4'	8.92
5'	4.3
6'	3.25
7'	13.0
8'	5.22
9'	10.6
10'	4.97

* HM1:IMSS una vez alimentada con bacterias-BrdUr, e irradiada con luz de longitud de onda de 310 nm.

el otro 33.3% mostró una fagocitosis semejante a la de la cepa silvestre. En la Tabla IV se describen los resultados de las clonas obtenidas a partir de la población HM1:IMSS 2X obtenida del segundo tratamiento de selección. El 90% de estas clonas fue deficiente en eritrofagocitosis y el 10% mostró una fagocitosis semejante a la de la cepa silvestre. Por último los resultados de eritrofagocitosis de las clonas obtenidas del tercer tratamiento, se muestran en la Tabla V. El 42.85% de las clonas fué deficiente en eritrofagocitosis en comparación con la cepa silvestre, el 44.4% mostró un grado de fagocitosis intermedio entre la cepa silvestre HM1:IMSS y las cepas deficientes en fagocitosis, mientras que el 14.2% presentó un grado de fagocitosis semejante al de la cepa silvestre HM1:IMSS.

8.- Porcentaje de células no fagocíticas.

En la Tabla VI se muestran los resultados obtenidos para las clonas que fueron seleccionadas por presentar fagocitosis y adhesión deficientes. En cada una de estas clonas se contaron los trofozoítos que no fagocitaron ningún eritrocito durante el tiempo de interacción. El porcentaje de células no fagocíticas varió para cada clona, fluctuando entre el 10% y el 50%. De la cepa HM1:IMSS, sólo el 5% de los trofozoítos no ingirieron eritrocitos después de 5 min de incubación a 37°C.

9.- Adhesión.

La virulencia de las cepas amibianas está determinada por una se-

TABLA IV

ERITROFAGOCITOSIS DE LAS CLONAS AISLADAS A PARTIR DE HM1:IMSS-2x*

C L O N A	ERITROCITOS/AMIBA
HM1:IMSS	8.97
1	4.37
2	3.47
3	3.24
4	4.39
5	3.65
6	7.08
7	3.58
8	3.65
9	4.17
10	4.08

* HM1:IMSS dos veces alimentada con bacterias-BrdUr e irradiada con luz de longitud de onda de 310 nm.

TABLA V

ERITROFAGOCITOSIS DE LAS CLONAS AISLADAS A PARTIR DE HM1:IMSS
3x*

C L O N A	ERITROCITOS/AMIBA
HM1:IMSS	7.66
2	5.96
3	2.96
5	5.93
6	5.07
7	7.29
8	3.48
9	3.75

* HM1:IMSS tres veces alimentada con bacterias-BrdUr e irradiada con luz de longitud de onda de 310 nm.

TABLA VI

PORCENTAJE DE CELULAS NO FAGOCITICAS

C L O N A	% CEL. NO FAG.
HM1:IMSS	5 %
BU ₁ 2	17.36%
BU ₁ 4	42 %
BU ₁ 6	52 %
BU ₁ 2'	16 %
BU ₁ 3'	33 %
BU ₁ 5'	37 %
BU ₁ 10	14 %
BU ₂ 2	29 %
BU ₂ 4	16 %
BU ₂ 5	24 %
BU ₂ 7	32.6 %
BU ₂ 8	34 %
BU ₃ 2	20 %
BU ₃ 3	27.3 %
BU ₃ 6	23.3 %
BU ₃ 8	18.6 %
BU ₃ 9	25.3 %

cuencia de eventos, entre otros, la adhesión, la destrucción celular y la fagocitosis. Se considera que la adhesión es el primero de los eventos que se llevan a cabo durante el mecanismo de agresión de la amiba, ya que es necesario que el trofozoíto se adhiera a la célula blanco, para posteriormente fagocitarla o destruirla.

Con el objeto de saber si la deficiencia en eritrofagocitosis, que presentaron algunas de las clonas aisladas en este trabajo, se debía a una falla en la superficie de los trofozoítos que impidiera su adhesión a los eritrocitos, se realizaron ensayos para medir la eficiencia de adhesión de las clonas deficientes en fagocitosis. En la Tabla VII se muestran los resultados obtenidos para cada una de las clonas aisladas a partir del primer tratamiento de selección. De las 18 clonas obtenidas de este primer tratamiento, el 38% fueron deficientes en adhesión. Los resultados son el promedio de la cuenta de los eritrocitos adheridos a 100 trofozoítos después de 5 min de incubación a 0°C de la mezcla celular.

Los resultados obtenidos de los ensayos de adhesión a eritrocitos de las clonas aisladas a partir del segundo tratamiento se muestran en la Tabla VIII. De estas clonas sólo el 10% fue deficiente en adhesión. Los resultados de los experimentos realizados para las clonas obtenidas a partir del tercer tratamiento se presentan en la Tabla IX, el 57% de estas clonas adhirió un menor número de eritrocitos humanos que la cepa

TABLA VII

ADHESION A ERITROCITOS DE LAS CLONAS AISLADAS A PARTIR DE
HM1:IMSS-1x*

C L O N A	ERITROCITOS/AMIBA
HM1:IMSS	10.38
1	4.97
2	7.06
3	3.57
4	7.0
5	9.1
6	7.89
7	5.7
8	4.03
1'	6.32
2'	2.55
3'	2.2
4'	7.22
5'	3.46
6'	3.19
7'	7.8
8'	5.83
9'	7.7
10'	5.47

HM1:IMSS una vez alimentada con bacterias-BrdU^r e irradiada con luz de longitud de onda de 310 nm.

TABLA VIII

ADHESION A ERITROCITOS DE LAS CLONAS AISLADAS A PARTIR DE
HM1:IMSS-2x*

C L O N A	ERITROCITOS/AMIBA
HM1:IMSS	8.97
1	11.11
2	5.84
3	6.98
4	4.33
5	8.49
6	11.51
7	7.6
8	7.72
9	8.73
10	8.71

HM1:IMSS dos veces alimentada con bacterias-BrdUr e irradiada con luz de longitud de onda de 310 nm.

TABLA IX

ADHESION A ERITROCITOS DE LAS CLONAS AISLADAS A PARTIR DE
HM1:IMSS-3x*

C L O N A	ERITROCITOS/AMIBA
HM1:IMSS	7.3
2	9.3
3	8.38
5	5.31
6	4.3
7	6.74
8	5.33
9	6.97

HM1:IMSS tres veces alimentada con bacterias-BrdUr e irradiada con luz de longitud de onda de 310 nm.

silvestre; sin embargo, de acuerdo al criterio arbitrario, definido anteriormente que para considerar una clona deficiente en adhesión o en fagocitosis ésta debe presentar cuando menos el 50% de deficiencia en comparación con la cepa silvestre, ninguna de estas clonas es deficiente en adhesión. Estos resultados sugieren que la deficiencia en fagocitosis de algunas de las clonas seleccionadas se debe a que presentan una menor eficiencia en la capacidad de adherir eritrocitos humanos que la cepa silvestre HM1:IMSS.

10.- Virulencia.

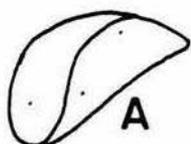
La virulencia de las cepas amibianas es un fenómeno en el que aparentemente están involucrados una serie de factores y propiedades de superficie de los trofozoítos. Entre las propiedades de superficie de los trofozoítos que se han relacionado con la virulencia, se encuentran la capacidad de los trofozoítos para aglutinar con lectinas del tipo de la concanavalina A (Bos, H.J. y Van de Griend, 1978; Trissl y col., 1976), la adhesión a diferentes tipos de células (Orozco, 1981; García-Rivera y col., 1982) y el grado de eritrofagocitosis (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1982), entre otros.

El objetivo que se planteó en este trabajo fue el estudio de la relación que existe entre la adhesión y la fagocitosis, con la virulencia de las cepas amibianas. Por lo tanto, las clonas seleccionadas por su deficiencia en adhesión y fagocitosis, se subcultivaron hasta fase

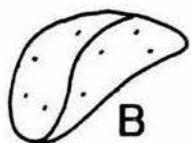
logarítmica para ser posteriormente inoculadas en hámster de aproximadamente 100 g de peso. Se prepararon lotes de 5 hámsters por clona, para medir su virulencia. Los trofozoítos fueron inoculados intraportalmente en un volumen de 0.5 ml de metio TY-1-S-33. A los siete días post-inoculación los animales fueron sacrificados, bajo anestesia, para examinar los hígados y el grado de las lesiones se clasificó arbitrariamente como a) microabscesos, cuando a simple vista el hígado se observa sano, pero al examinarse con una lupa se observan pequeños puntos de infección amibiana (Fig. 6-A); b) abscesos pequeños, cuando a simple vista se observan pequeños puntos de infección (menores de 1 mm) y además estos puntos eran muy dispersos sobre la superficie del hígado (Fig. 6-B); c) abscesos medianos, los puntos de infección eran un poco mayores (1 mm aproximadamente) aunque seguían siendo dispersos sobre la superficie (Fig. 6-C); d) abscesos grandes, los puntos de infección eran mayores de 1 mm y cubrían una mayor parte de la superficie del hígado (Fig. 6-D) y e) abscesos generalizados, la infección amibiana casi cubría por completo el hígado, observándose la superficie en casi su totalidad afectada (Fig. 6-E).

En la Tabla X se observan los resultados de la medición de la virulencia obtenidos para cada una de las clonas elegidas por su deficiencia en fagocitosis y/o adhesión. La virulencia de las clonas obtenidas a partir de la población HM1:IMSS 1x fue generalmente baja, a excepción de la clona BU₁ 10, la cual mostró la mayor virulencia. Sin embargo, las lesiones producidas por trofozoítos de estas clonas, cuando las produje--

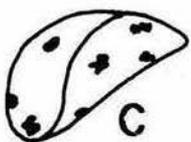
**CARACTERIZACION DE LOS ABSCESOS
HEPATICOS AMIBIANOS EN
HAMSTERS JOVENES**



MICROABSCESOS



ABSCESOS PEQUEÑOS



ABSCESOS MEDIANOS



ABSCESOS GRANDES



ABSCESOS GENERALIZADOS

TABLA X
 VIRULENCIA DE CLONAS DE E. HISTOLYTICA (HM1:IMSS)

CEPA	*HA/HI	% HÁMSTERS C/ABSCESO	CARACTERÍSTICAS DE LOS ABSCEOS
BU ₁ 2	1/5	20%	Medianos
BU ₁ 4	1/5	20%	Medianos
BU ₁ 6	3/5	60%	Microabscesos
BU ₁ 2'	2/5	40%	Medianos
BU ₁ 3'	1/5	20%	Pequeños
BU ₁ 5'	1/5	20%	Medianos
BU ₁ 10	3/4	75%	Microabscesos
BU ₂ 2	2/5	40%	Pequeños
BU ₂ 4	5/8	62%	Grandes
BU ₂ 5	2/5	40%	Microabscesos
BU ₂ 8	4/10	40%	Medianos
BU ₃ 2	2/5	40%	Microabscesos
BU ₃ 3	0/5	0	-----
BU ₃ 6	6/10	60%	Medianos
BU ₃ 8	3/5	60%	Microabscesos
BU ₃ 9	5/10	50%	Medianos
Clona A	16/18	90%	Generalizados

BU₁ Clonas seleccionadas a partir de la población HM1:IMSS 1x

BU₂ Clonas seleccionadas a partir de la población HM1:IMSS 2x

BU₃ Clonas seleccionadas a partir de la población HM1:IMSS 3x

* Hámsters con absceso/hámsters inoculados.

ieron, fueron en su mayoría leves aun en el caso de la clona BU₁ 10.

La virulencia de las clonas obtenidas de la segunda irradiación fue semejante, ya que la mayoría de ellas produjo abscesos en el 40% de los hámsters inoculados, a excepción de la clona BU₂ 4 que produjo abscesos en el 62% de los animales. Las lesiones producidas por estas clonas fueron también en su mayoría leves, a excepción de la clona BU₂ 4 en la cual las lesiones fueron más severas.

Las clonas obtenidas a partir de la tercera irradiación produjeron abscesos en un porcentaje mayor de animales que en los casos anteriores. Sin embargo, las lesiones producidas por los trofozoítos de estas clonas fueron mínimas en todos los casos. En este último lote se obtuvo una clona no virulenta, en comparación con la clona A, pues no produjo abscesos en ninguno de los casos experimentales.

DISCUSION

1.- Algunos factores de virulencia de las cepas amibianas.

La virulencia de E. histolytica es un proceso multifactorial que involucra una serie de pasos, entre otros, la adhesión de la amiba a la célula blanco, la colonización del tejido que invade, la posible se creción de enzimas y/o toxinas que faciliten su invasión y la fagocito sis. En cada una de estos procesos participan a su vez una serie de factores, los cuales son, en general, desconocidos.

De entre las funciones celulares que participan en el mecanismo de agresión de E. histolytica, la fagocitosis parece ser un fenómeno determinante. Su importancia en la patogenicidad amibiana está apoya da por los reportes de varios autores, en los que se presentan eviden cias sobre la correlación directa entre la velocidad de eritrofagocitosis y la virulencia de las cepas de E. histolytica (Trissl y col., 1978; Orozo y col., 1980; Martínez-Palomo, 1980b). Por otra parte también en amibas patógenas de vida libre se ha descrito que la fagoci tosis es uno de los procesos que participa en la invasión de los trofozoítos a los tejidos. Visvervara y Callaway (1974) encontraron que los trofozoítos de Naegleria fowleri llevan a cabo la invasión y des trucción del tejido cerebral por medio de la fagocitosis.

Es generalmente aceptado que la asociación de los trofozoítos con bacterias aumentan la patogenicidad de las cepas de E. histolytica

(Bos, y Van de Griend, 1977; Wittner y Rosenbaum, 1970). Algunos reportes en la literatura indican que hay un incremento en la virulencia amibiana cuando se asocian trofozoítos en cultivo con bacterias no patógenas y que por otra parte, el cultivo axénico prolongado de las cepas amibianas disminuye la virulencia de éstas (Vicent y Neal, 1960; Bos y Van de Griend, 1977). La virulencia de las cepas se incrementa también cuando los trofozoítos son inoculados en el hígado de roedores y posteriormente subcultivados a partir de las lesiones que producen (Lushbaugh y col., 1978). Es probable que la asociación de los trofozoítos con bacterias y el pasaje de éstos a través del hígado de roedores ejerzan una presión selectiva a favor de las amibas más fagocíticas y más capaces de colonizar el tejido hepático.

El método de aislamiento y el cultivo axénico prolongado podrían ser los factores responsables de que los cultivos de las cepas amibianas representaran una mezcla de células con diversos fenotipos de virulencia, fagocitosis y otras propiedades, ya que no ha sido reportada la clonación de estas cepas. Por otra parte, no es posible descartar la mutación espontánea en los cultivos amibianos, a través de su mantenimiento por largo tiempo en el laboratorio.

2.- Método de selección de trofozoítos deficientes en fagocitosis.

Los objetivos generales de este trabajo fueron determinar el grado de heterogeneidad que existe entre los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS

y aportar evidencias de que el grado de fagocitosis de los trofozoítos está íntimamente relacionado con la habilidad de éstos para colonizar el hígado de hámster. En este trabajo se ha analizado el papel de la fagocitosis en la virulencia de E. histolytica a través de la selección de clonas deficientes en fagocitosis y de la determinación de la virulencia de estas clonas. Los resultados obtenidos muestran una correlación directa entre la virulencia y la velocidad de fagocitosis de las clonas seleccionadas. Por otra parte, estos resultados indican que la cepa HM1:IMSS está compuesta por una población en la que se encuentran trofozoítos con diferente grado de eritrofagocitosis y de virulencia. A partir de los datos presentados en este trabajo se puede concluir que esta cepa es heterogénea.

El método de selección de trofozoítos deficientes en fagocitosis a partir de la cepa HM1:IMSS, altamente fagocítica y virulenta, fue descrito por Clarke para la selección de mutantes de motilidad de Dictyostelium discoideum (Clarke, 1978) y modificado por Orozco (1981) para la obtención de la clona L-6 de E. histolytica que es deficiente en fagocitosis. La estrategia de selección de trofozoítos deficientes en fagocitosis consistió en buscar un protocolo que permitiera eliminar a los trofozoítos altamente fagocíticos y aislar clonas que presentarían un grado de fagocitosis menor que el de la cepa silvestre HM1:IMSS. La eliminación de los trofozoítos altamente fagocíticos se llevó a cabo cuando éstos se incubaron con bacterias E. coli cepa CR 34 Thy⁻ crecidas con BrdU_r. Los trofozoítos que ingirieron un gran número de bacte-

rias, incorporaron en su DNA la BrdUr que llevaban éstas, lo que ocasionó la ruptura del DNA amibiano cuando los trofozoítos fueron irradiados con luz de 310 nm. Esto, obviamente provocó la muerte de los trofozoítos que ingirieron un gran número de bacterias.

El tratamiento sucesivo de los trofozoítos con el método de selección (B-BrdUr + luz de 310 nm) mostró que las subpoblaciones obtenidas después de los diversos tratamientos presentaron cada vez mayor resistencia a la irradiación con luz de 310 nm. Estos resultados sugirieron que la población amibiana varias veces tratada incorporaba con menor eficiencia la BrdUr en su DNA, probablemente debido a que la fagocitosis de las bacterias por los trofozoítos no era tan eficiente como la de la cepa silvestre, o bien, podría ser que las bacterias fueran ingeridas por los trofozoítos, pero la BrdUr por alguna razón no fuera incorporada en el DNA amibiano. Aunque esta última posibilidad no se probó directamente, el hecho de que las clonas aisladas a partir de las subpoblaciones varias veces tratadas (B-BrdUr + luz de 310 nm) presentaran deficiencia en la fagocitosis de eritrocitos, indica que es más probable que la resistencia a la irradiación con luz de 310 nm se deba a una deficiencia en el proceso de ingestión.

Por otra parte, la selección de amibas resistentes al tratamiento (B-BrdUr + luz de 310 nm) a partir de un número de trofozoítos relativamente pequeño (1.5×10^6) sugiere que la cepa silvestre HMI:IMSS presenta un alto grado de heterogeneidad. Esto se ve apoyado por el

hecho de que a partir de la clona A, proveniente de la cepa HMI:IMSS, no fue posible obtener trofozoítos resistentes al tratamiento en ningún experimento. Por otra parte, la ingestión de bacterias crecidas en timidina no sensibilizó a los trofozoítos a la irradiación con luz de 310 nm, ya que la disminución de la población de los experimentos control fue en todos los casos menor al 50%.

3.- Eficiencia del método de aislamiento.

La eficiencia del método de aislamiento de clonas de E. histolytica deficientes en fagocitosis aumentó sensiblemente del primer tratamiento al segundo tratamiento; puesto que en el primer tratamiento el 33% de clonas aisladas fue deficiente en fagocitosis y en el segundo el 90%. Sin embargo, la eficiencia del método bajó drásticamente en el tercer tratamiento en el que sólo el 42.1% de las clonas aisladas presentó deficiencia en fagocitosis. Aunque no tenemos una explicación clara de esto, es probable que los trofozoítos tipo silvestre presentes en la población 2 veces irradiada se multiplicara lo suficiente para abatir el porcentaje de células deficientes en fagocitosis. Por otra parte, el número relativamente pequeño de clonas aisladas a partir del tercer tratamiento podría explicar parcialmente el hecho de que se obtuviera un porcentaje menor de clonas deficientes en fagocitosis. Sin embargo, la clona con mayor deficiencia en fagocitosis, se obtuvo a partir del tercer tratamiento.

4.- BrdUr como agente mutagénico.

Ha sido reportada que la BrdUr puede ser un agente mutagénico en células de mamífero (Ashman y Davidson, 1981). Sin embargo, en los experimentos realizados en este trabajo es poco probable que las clonas deficientes en fagocitosis hayan sido obtenidas por mutagénesis, ya que el tiempo de contacto de los trofozoítos con la BrdUr fue muy corto en comparación con el tiempo en que este mutágeno ha sido utilizado en otros sistemas para obtener mutantes de células de mamífero. Ashman y Davidson (1981) reportaron que para la obtención de mutantes de una línea celular de melanoma de hámster Sirio con desequilibrio en las porzas de deoxiribonucleótidos, fue necesario que el cultivo estuviera en contacto con aproximadamente 6 µg/ml de BrdUr durante 3 días. Los trofozoítos de E. histolytica solo estuvieron 2 horas en contacto indirecto con la droga ya que ésta fué primero incorporada en las bacterias. Aunque la dosis que se añadió al medio de crecimiento de las bacterias fue 50 µg/ml, la mayoría de la BrdUr probablemente se quedó en el medio de crecimiento de las bacterias y las amibas estuvieron en contacto sólo con la droga que incorporaron las bacterias. Por otra parte, el número de células que se utilizó por experimento para obtener las clonas deficientes es relativamente pequeño para inducir mutantes. El argumento más fuerte para descartar la mutagénesis de los trofozoítos por el tratamiento (B-BrdUr + luz de 310 nm) es el hecho de que a partir de la clona A alimentada con B-BrdUr e irradiada con luz de 310 nm no fué posible aislar clonas deficientes en fagocitosis.

5.- Crecimiento en medio semisólido.

Gillin y Diamond (1978) reportaron que la capacidad de los trofozoítos para crecer en medio semisólido presenta relación con la virulencia de las cepas amibianas. Por otra parte, Orozco y col., (1982) encontraron que la clona L-6 proveniente de HM1:IMSS y deficiente en virulencia y fagocitosis presentaba deficiencia por el medio semisólido reportado por Gillin y Diamond (1978). Sin embargo, Orozco (1981) encontró que las cepas amibianas HK9 y HM3:IMSS de diferente virulencia, presentaban un EFC semejante en medio semisólido.

En este trabajo, se aislaron clones deficientes en fagocitosis por clonación en medio semisólido. Los resultados de esta tesis muestran que clones deficientes en fagocitosis y en virulencia son capaces de crecer en medio semisólido. La EFC de la cepa silvestre HM1:IMSS fue mayor que la de las subpoblaciones sometidas al tratamiento de selección. Sin embargo, a partir de estos resultados no se puede afirmar que la disminución de la EFC esté relacionada con los fenómenos de fagocitosis y virulencia.

6.- Eritrofagocitosis y adhesión.

El método de enriquecimiento y selección de trofozoítos por ingestión de bacterias marcadas con BrdU_r nos permitió aislar con eficiencia clones provenientes de la cepa HM1:IMSS con un menor grado de eritrofagocitosis. Algunas de estas clones fueron deficientes en adhesión (adh^-) y otras en ingestión de eritrocitos (ing^-). En cuanto a las clones de-

ficientes en ingestión es fácil pensar que si el trofozoíto presenta poca habilidad para ingerir un tipo de partícula como las bacterias, esta falta de habilidad se manifestará también en la ingestión de cualquier otro tipo de partículas; como esferas de latex, eritrocitos, etc. En el caso de el aislamiento de trofozoítos deficientes en adhesión a eritrocitos, obtenidos por el método de selección descrito en este trabajo, en el que se utilizaron bacterias, la interpretación de los resultados es más complicada. Se ha sugerido que los trofozoítos se adhieren a las bacterias por receptores diferentes a los que participan en la adhesión de eritrocitos (Orozco, 1981). Estos reportes se apoyan en el hecho de que la adhesión a eritrocitos es inhibida por polímeros de N-Acetil glucosamina, mientras que la adhesión a cierto tipo de bacterias es inhibida por α -metil manosa (Orozco, 1981; Bracha y col., 1982). En la cepa E. coli CR 34 Thy⁻ no se ha probado la inhibición de la adhesión a los trofozoítos con algún carbohidrato del tipo de los mencionados, por lo que no se puede agrupar a las bacterias utilizadas en estos ensayos, con las bacterias probadas por Bracha y col., (1982) en las que la adhesión es inhibida por α -metil manósido. Por otra parte, el crecimiento de las bacterias con BrdUr altera notablemente la morfología de éstas (Fig. 1) y esta alteración a su vez podría repercutir en la distribución de los receptores de la bacteria, y en la adhesión de ésta a la amiba. Será necesario realizar experimentos de adhesión con bacteria CR 34 Thy⁻ crecidas con BrdUr para dilucidar si se altera o no la eficiencia de adhesión en comparación con la cepa bacteriana tipo silves

tre y con la cepa CR 34 Thy⁻. Por otra parte, es necesario realizar un mayor número de experimentos para definir si algunas bacterias comparten con los eritrocitos receptores de superficie, que participen en el evento de adhesión a la amiba.

El proceso de fagocitosis comprende cuando menos dos fases, la adhesión de la partícula, que va a ingerir, a la superficie celular, la cual puede ser altamente específica y la introducción de dicha partícula al citoplasma amibiano. Estos dos eventos, son relativamente independientes como lo demuestran los experimentos con diferentes cepas amibianas, en las que los trofozoítos que presentan adhesión semejante como los de las cepas HM1:IMSS, HM3:IMSS, HK9 y de la clona L-6 presentan diferentes grados de eritrofagocitosis (Orozco, 1981). Las clonas deficientes en fagocitosis obtenidas en este trabajo fueron estudiadas para definir si esta deficiencia se debía a una falla en la adhesión de los eritrocitos a la superficie amibiana o bien a la incapacidad de los trofozoítos para introducir al citoplasma los eritrocitos adheridos eficientemente.

Las clonas deficientes en fagocitosis obtenidas en este trabajo a partir de las tres poblaciones HM1:IMSS 1X, HM1:IMSS 2X y HM1:IMSS 3X. pueden dividirse en dos grandes grupos:

a) Aquellas que presentan deficiencia en adhesión, y que ésta sea la responsable de la deficiencia en fagocitosis. Reiterando la definición arbitraria de que se considerarán clonas deficientes en adhesión o

en fagocitosis, aquellas que su eritrofagocitosis y/o adhesión sea el 50% o menos que el de la cepa silvestre HM1:IMSS. Estas clonas deficientes en adhesión (Tabla XI) presentan homogeneidad entre sí en cuanto al número de eritrocitos que adhieren e ingieren por unidad de tiempo, por lo que es probable que pertenezcan a un mismo grupo, es decir, que provengan todas de un trofozoíto con deficiencia en adhesión, lo que da como resultado una deficiencia en el grado de fagocitosis.

Si esta aseveración se toma como probable, las clonas adh^- integrarían una subpoblación de la cepa HM1:IMSS deficiente en fagocitosis con un promedio de eficiencia de adhesión, obtenido a partir de las 8 clonas de la Tabla XI, de 3.5 eritrocitos/amiba, que comparado con la cepa silvestre nos permite determinar que la deficiencia en adhesión de la subpoblación adh^- sería de 60.2% y el promedio de fagocitosis, 4.15 que correspondería a una deficiencia de 51.4%.

b) La segunda subpoblación estaría formada por trofozoítos cuya deficiencia en fagocitosis se deba a una deficiencia en la introducción de las partículas adheridas.

Las clonas de la Tabla XII presentan también cierta homogeneidad entre sí en cuanto al número de eritrocitos adheridos y fagocitados por lo que es probable que como se sugiere para el caso de la población adh^- provenga de un trofozoíto que tiene eficiencia de adhesión semejante a la cepa silvestre HM1:IMSS, pero presenta una deficiencia en la introducción de eritrocitos (ing^-), de 56.72%. Estos datos pueden compararse

TABLA XI

CLONAS DEFICIENTES EN ADHESION

CEPA	ADHESION	FAGOCITOSIS	A/F
HM1IMSS	8.8	8.57	1.02
BU ₁ 1	4.97	5.25	0.94
BU ₁ 3	3.57	ND	-
BU ₁ 2'	2.55	3.22	0.79
BU ₁ 3'	2.2	3.56	0.61
BU ₁ 5'	3.46	4.3	0.8
BU ₁ 6'	3.19	3.25	0.98
BU ₂ 4	4.33	4.39	0.98
BU ₃ 6	4.3	5.07	0.84
PROMEDIO	3.5	4.14	0.84

TABLA XII

CLONAS DEFICIENTES EN INGESTION

C E P A	ADHESION	FAGOCITOSIS	A/F
HM1:IMSS	8.8	8.55	1.02
BU ₁ 4	7.0	3.89	1.7
BU ₁ 6	7.89	3.96	1.9
BU ₂ 1	11.11	4.37	2.54
BU ₂ 2	5.84	3.47	1.68
BU ₂ 3	6.98	3.24	2.15
BU ₂ 5	8.49	3.65	2.32
BU ₂ 7	7.6	3.58	2.12
BU ₂ 8	7.72	3.65	2.11
BU ₂ 9	8.73	4.17	2.09
BU ₂ 10	8.71	4.08	2.13
BU ₃ 3	8.38	2.96	2.83
BU ₃ 8	5.33	3.48	1.53
BU ₃ 9	6.97	3.75	1.85
PROMEDIO	7.75	3.7	2.09

con los obtenidos por Orozco (1981) para la clona L-6, sin embargo, como se discute a continuación sólo la clona BU₃ ing⁻ no produjo absceso hepático en hámsters jóvenes, aunque su virulencia es menor en todos los casos que la de la cepa silvestre y la de la clona A. Por lo tanto, en las clonas ing⁻ podemos sugerir cuando menos la presencia de dos grupos de clonas con virulencia diferente. En el primer grupo estarían aquellas clonas que presentaron una menor virulencia que la clona A y que la cepa HM1:IMSS pero que si produjeron abscesos en hámsters jóvenes con inóculo de 2.5×10^5 trofozoítos. En el segundo grupo estarían la clona BU₃ y la clona L-6 (Orozco, 1981) que no produjeron abscesos en ninguno de los hámsters inoculados con 2.5×10^5 trofozoítos.

7.- Eritrofagocitosis y Virulencia.

El objetivo principal de esta tesis fue determinar la relación de la virulencia con la fagocitosis de las clonas seleccionadas. En la Tabla XIII se muestra el resumen de los datos de las clonas deficientes en fagocitosis obtenidas en este trabajo. Las clonas deficientes en fagocitosis tanto las adh⁻ como las ing⁻ presentan disminución en la habilidad de los trofozoítos para producir abscesos hepáticos en hámsters jóvenes. Esta disminución se observó tanto en el porcentaje de hámsters inoculados que presenta abscesos como en el tamaño de los mismos.

Si se analizan los datos, tomando en cuenta la agrupación que se hizo anteriormente de la clonas deficientes en fagocitosis en clonas

TABLA XIII

ERITROFAGOCITOSIS, ADHESION Y VIRULENCIA DE LAS CLONAS SELECCIONADAS

CEPA	GRUPO	ERITROFAGOCITOSIS	ADHESION	HA/HT	CARACTERISTICAS DE LOS ABSCESOS
Clona A	-	8		16/18	Generalizados
HMI:IMSS	-	8.5	8.8	17/18	Generalizados
BU ₁₂	-	5.21	7.06	1/5	Medianos
BU ₁₄	Ing ⁻	3.89	7.0	1/5	Medianos
BU ₁₆	Ing ⁻	3.96	7.89	3/5	Microabscesos
BU ₂₂	Ing ⁻	3.47	5.84	2/5	Pequeños
BU ₂₅	Ing ⁻	3.65	8.49	2/5	Microabscesos
BU ₂₈	Ing ⁻	3.65	7.72	4/10	Medianos
BU ₃₃	Ing ⁻	2.96	9.3	0/5	
BU ₃₈	Ing ⁻	3.48	5.33	3/5	Microabscesos
BU ₃₉	Ing ⁻	3.75	6.97	5/10	Medianos
BU ₁₂ ⁺	Adh ⁻	3.22	2.55	2/5	Medianos
BU ₁₃ ⁺	Adh ⁻	3.35	2.2	1/5	Pequeños
BU ₁₅ ⁺	Adh ⁻	4.3	3.46	1/5	Medianos
BU ₂₄	Adh ⁻	4.39	4.33	5/8	Grandes
BU ₃₆	Adh ⁻	5.07	4.3	6/10	Medianos

adh⁻ e ing⁻ se puede observar que el 83% de clonas adh⁻ produjeron abscesos pequeños de acuerdo a la clasificación arbitraria que se hizo del tamaño de los abscesos (Fig. 6). Por otra parte si se analizan los datos de esta misma tabla se observa que el 50% de las clonas adh⁻ produjeron abscesos en el 20% de los hámsters inoculados, mientras que el 33% de las clonas produjeron abscesos en el 60% y el 16% en el 40% de los animales.

Las clonas ing⁻ no produjeron abscesos grandes en ninguno de los hámsters inoculados; el 37.5% de las clonas ing⁻ produjeron abscesos medianos, el 50% de estas clonas produjeron abscesos entre microscópicos y pequeños y el 12.5%, no produjeron abscesos en ninguno de los hámsters inoculados. Por otra parte, el 12.5% de las clonas produjeron abscesos en el 20% de los animales, el 37.5% en el 40% el 12.5% en el 50% y el 25% en 60% de los animales pero en este último caso, los abscesos solo fueron distinguibles a los 8 días post-inoculación con lupa (microabscesos). Estos datos podrían sugerir que al disminuir la eficiencia de adhesión disminuye también la eficiencia de fagocitosis y como consecuencia disminuye la habilidad de los trofozoítos para colonizar el hígado de hámster y producir absceso hepático. Sin embargo, cuando la deficiencia se localiza en la ingestión la disminución de la habilidad de los trofozoítos para colonizar el hígado es mayor. Estos datos podrían corroborarse en el futuro con la obtención de mutantes amibianos independientes y deficientes en diferentes pasos de la fagocitosis.

8.- Paquete estadístico.

Se realizó el análisis estadístico de cada uno de los diferentes tratamientos de selección por medio de una computadora (Univac 1100 time/ Sharing) utilizando el paquete estadístico SPSS, Subrutina oneway (Nie, H. Norman y col , 1975). De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de varianza (Tabla XIV), la prueba de Cochrams demostró que el rango de varianza entre los grupos obtenidos de cada tratamiento fue de 0.1667 a 0.3242 lo que demuestra que el error de manipulación para cada una de las clonas fué semejante. Esto permitió manejar los datos con un análisis de varianza para datos uniformes. De los resultados obtenidos a partir de este análisis de varianza se infiere que en un mismo tratamiento se obtuvieron algunas clonas o grupos con comportamiento diferente en cuanto a la velocidad de fagocitosis y/o adhesión, que correlacionó con la virulencia de las clonas.

Se realizaron varias pruebas, para clasificar las diferentes clonas en grupos de acuerdo a su velocidad de fagocitosis y/o adhesión. Por medio de estas pruebas se clasificaron las clonas en tres grupos; un grupo con fagocitosis alta similar a la cepa silvestre; un grupo con fagocitosis y/o adhesión intermedio y por último un grupo deficiente en fagocitosis y/o adhesión.

TABLA XIV
PAQUETE ESTADISTICO SPSS

TRATAMIENTO DE SELECCION	ENSAYO	ANALISIS DE VARIANZA DE COCHRAN	F. PROBABLE	GRUPO DEFICIENTE	GRUPO INTERMEDIO	GRUPO ALTO
1°	Eritrofagocitosis	0.1635	0.000	4,6,2',3', 5', 6'	1,2,3,5,7, 7',10'	8,1',4',8', 9',HM1:IMSS
1°	Adhesión	0.1705	0.000	3,2',3',5', 6'	1,7,8,1', 4',7',8',10'	2,4,6,9' HM1:IMSS
2°	Eritrofagocitosis	0.1817	0.000	2,3,4,5,7 8,9.	1,10	6 HM1:IMSS
2°	Adhesión	0.1744	0.000	4	2,5,9,10	1,3,6,7 HM1:IMSS
3°	Eritrofagocitosis	0.3242	0.002	1,2,7	3,6	4,5 HM1:IMSS
3°	Adhesión	0.1667	0.000	6	2,3,4,5, 7	1 HM1:IMSS

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que:

- a) El método de selección empleado permitió el aislamiento de clones deficientes en fagocitosis y adhesión.
- b) La cepa HM1:IMSS presenta un alto grado de heterogeneidad.
- c) La clona A es una población homogénea de la que no se pudieron aislar clones deficientes en adhesión y/o en eritrofagocitosis.
- d) Las clones deficientes en fagocitosis y adhesión son capaces de crecer en medio semisólido.
- e) A partir de las clones aisladas se encontraron dos grandes grupos:
 - 1.- Aquellos que presentaron deficiencia en adhesión y que parece ser que ésta es la responsable de la deficiencia en fagocitosis.
 - 2.- Aquellos cuya deficiencia en fagocitosis se debe a una deficiencia en la introducción de las partículas adheridas.
- f) Las clones deficientes en fagocitosis presentaron un grado menor de virulencia. La disminución en la virulencia fué mayor cuando la deficiencia se presentó en la introducción de las partículas al citoplasma.

REFERENCIAS

- Artigas, J.; Otto, I.; Kawada, M. E. Acción de Entamoeba histolytica sobre leucocitos polimorfonucleares humanos vivos. Bol. Chil. Parasitol. 21: 114. 1966.
- Ashman, Ch. R. y Davidson, R. L. Bromodeoxyuridine mutagenesis in mammalian cells is related to deoxyribonucleotide pool imbalance. Mol. Cel. Biol. 3: 254. 1981.
- Bos, H. J. y Van de Griend, R. J. Virulence and toxicity of axenic Entamoeba histolytica. Nature 265: 341. 1977.
- Bos, H. J. y Van de Griend, R. J. Symposium on the virulence of Entamoeba histolytica: c) variable toxicity within the HK9 strain of Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 167. 1978.
- Bracha, R.; Kobilier, D. y Mirelman, D. Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of Entamoeba histolytica. Inf. Imm. 36: 1. 1982.
- Cervantes, A. C. Estudios de los procesos de división celular y nuclear en Entamoeba. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular CINVESTAV-IPN. 1980.

- Clarke, M. A selection method for isolating motility mutants of Dictyostelium discoideum. Cell Reproducction. Academic Press. New York. p. 621. 1978.
- Chávez, B.; Martínez-Palomo, A. y de la Torre, M. Estructura ultra-microscópica de la pared de quistes de Entamoeba invadens E. histolytica y E. coli. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 113. 1978.
- Chávez, A.; Iturbe-Alessio, F.; Segura, M. y Corona, D. Fagocitosis de eritrocitos humanos por Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 3 (Supl. 2): 275. 1972.
- Chávez, A. y Segura, M. Interacción entre los trofozoítos de E. histolytica y los leucocitos de varias especies animales. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 5 (Supl. 2): 373. 1974.
- De la Torre, M.; De la Hoz, R. y Filloy, L. Cultivos axénicos de cepas mexicanas de E. histolytica HM2:IMSS y HM3:IMSS. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 5 (Supl. 2): 279. 1974.
- Diamond, L. S. Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 and E. histolytica like amoebae. J. Parasitol. 54: 1047. 1968.

- Diamond, L. S.; Phillips, B. P. y Bartgis, I. L. A comparison of the virulence of nine strains of axenically cultivated E. histolytica in hamster liver. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 5 (Supl. 2): 423. 1974.
- Diamond, L. S.; Harlow, D. R. y Cunnick, C.C. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 431. 1978.
- Eaton, R. D.; Meerovitch, E. y Costerton, J. W. A surface active lysosome in Entamoeba histolytica. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 63: 678. 1969.
- Eaton, R. D.; Meerovitch, E. y Costerton, J. W. The functional morphology of pathogenicity of Entamoeba histolytica. Ann. Trop. Med. Parasitol. 64: 229. 1970.
- García-Rivera, G.; Sánchez, T.; Orozco, E. y Guarneros, G. Aislamiento de clonas de E. histolytica deficientes en adhesión a eritrocitos humanos. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 13 (Supl. 3): 129. 1982.
- Garvey, J. S.; Cremer, N. E. y Sussdorf, D. H. Reagents. Cap. VI. En: Methods in immunology. Editor. W. A. Benjamin, INC. Reading Massachusetts. 3a. edición. 1977.

- Gillin, F. D. y Diamond, L. S. Clonal growth of Entamoeba histolytica and other species of Entamoeba in agar. J. Proto. 25(4): 539. 1978.
- Gillin, D. F. y Diamond, L. S. Attachment of Entamoeba histolytica to glass in a defined maintenance medium: Specific requirement for cysteine and ascorbic acid. J. Proto. 27 (4): 474. 1980.
- Gutiérrez, G.; Luslow, A.; Espinoza, G.; Herrera, S.; Muñoz, O.; Rattoni, N. y Sepúlveda, B. Encuesta serológica nacional. Investigación de anticuerpos contra Entamoeba histolytica en la República Mexicana. En: Conferencia Internacional Sobre Amibiasis. Editores. B. Sepúlveda y L. S. Diamond. IMSS México. p. 559. 1976.
- Jarumilinta, R. y Kradolfer, F. The toxic effect of Entamoeba histolytica on leukocytes. Ann. Trop. Med. Parasitol. 58: 375. 1964.
- Jones, T. C. y Dove, W. F. Photosensitization of transcription by bromodeoxyuridine substitution. J. Mol. Biol. 64: 409. 1972.
- Kagan, I. G. Seroepidemiology of amebiasis. En: Conferencia Internacional Sobre Amibiasis. Editores. B. Sepúlveda y L. S. Diamond. IMSS Méx. p. 574. 1976.

- Knight, I. G. An in vitro model for measuring the cytopathic effect of Entamoeba histolytica. J. Parasitol. 63: 388. 1977.
- Kudo, R. R. Protozoología. Editorial C.E.C.S.A. 4a. Edición. México 1976.
- Landa, L.; Aubane, M.; Segovia, E. y Sepúlveda, B. Seroepidemiología de la amibiasis en adultos. Arch.Inv.Méd. (Méx.) 2: 377. 1972.
- López-Revilla, R. y Said-Fernández, S. Cytopathogenicity of Entamoeba histolytica: hemolytic activity of trophozoite homogenates. Ann. J. Trop. Med. Hyg. 29 (2): 209. 1980.
- Lushbaugh, W. B.; Kairalla, A. B.; Loadholi, C. B. y Pittman, F. E. Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated Entamoeba histolytica. Ann. J. Trop. Med. Hyg. 27: 248. 1978.
- Martínez-Palomo, A.; González-Robles, A. y Chávez, B. Estructura ultra microscópica de varias cepas de Entamoeba. En: Conferencia Internacional Sobre Amibiasis. Editores. B. Sepúlveda y L. S. Diamond. IMSS. Méx. p. 214. 1976.
- Martínez-Palomo, A.; Tanimoto-Weki, M. y Tena-Betancourt, E. Evolución de las lesiones producidas en hámsters por inoculación de E. histolytica. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 11 (Supl. 1): 169. 1980a.

- Martínez-Palomo, A; Orozco, E. y González-Robles, A. Entamoeba histolytica: Topochemistry and dynamic of the cell surface. En: The Host Invader Interplay. Van den Bosche. (Editor). Elsevier North Holland Biom. Press. Amsterdam. p. 55. 1980b.
- Mattern, C. F. T. y Keister, D. B. Experimental amebiasis II. Hepathic amebiasis in the newborn hamster. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 402. 1977.
- McCaul, R. F. y Bird, R. G. Surface features of Entamoeba histolytica and rabbit kidney (RK13) cell surface changes after trophozoite contact. Observations by scanning electron microscopy. Int. J. Parasitol. 7: 383. 1977.
- Muñoz, M. L.; Calderón, J. y Rodjkind, M. The collagenase of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 155: 42. 1982.
- Nie, H. Norman; Haddlai-Hull, C.; Jenkins, G. J.; Steinbrenner Karin y Bent Dale, H. Statistical Package for the Social Sciencies. Mc Graw-Hill Book Company. Segunda Edición. New York. 1975.
- Novikoff, A. B.; Novikoff, P. M.; Davis, C. y Quintana, N. Studies on microperoxisomes. II A cytochemical method for light and electron microscopy. J. Histochem. Cytochem. 20: 1006. 1972.

- Orozco, E. Efecto citopático de Entamoeba histolytica sobre células en cultivo. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular. CINVESTAV-IPN. 1978.
- Orozco, E.; Martínez-Palomo, A. y López-Revilla, R. Un modelo in vitro para el estudio cuantitativo de la virulencia de E. histolytica. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 9: 257. 1978.
- Orozco, E.; Martínez-Palomo, A. y Guarneros, G. Virulencia y propiedades de superficie de varias cepas axénicas de Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 11: 153. 1980.
- Orozco, E. Virulencia y propiedades de superficie de Entamoeba histolytica. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular. CINVESTAV-IPN. 1981.
- Orozco, E.; Guarneros, G. y Martínez-Palomo, A. Clonas de E. histolytica deficientes en fagocitosis presentan deficiencia en virulencia. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 13(Supl. 3): 137. 1982.
- Phillips, B. P. E. histolytica concurrent irreversible loss of infectivity pathogenicity and encystment potential after prolonged maintenance in axenic culture in vitro. Exp. Parasit. 34: 163. 1973.

- Pizzi, T. Observaciones sobre fagocitosis de eritrocitos por Entamoeba moshkovskii Tshalia, 1941. Bol. Chil. Parasitol. 11: 7. 1956.
- Rabinovitch, M. y de Stefano, M. Phagocytosis of eritrocytes by Acantamoeba sp. Exp. Cell. Res. 64: 275. 1971.
- Ravdin, J. I.; Croft, B. Y. y Guerrant, R. L. Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152: 377. 1980.
- Richard, C. S.; Goldman, M. y Cannon, L. T. Cultivation of Entamoeba histolytica and Entamoeba histolytica like strains at reduced temperature and behavior of the amebas in diluted medio. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 15: 648. 1966.
- Robbins, J. R.; Schnererson, R.; Egan, W. B.; Vann, W. y Liv, D. T. Virulence properties of bacterial capsular polysaccharides- unanswered questions. En: The Molecular Basis of Microbial Pathogenicity. Editores. H. Smith, J. J., Skehel y M. J. Turner. Weinheim Verlag Chemic. 115. 1980.
- Robinson, G. L. The laboratory diagnosis of human parasitic amoeba. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 62: 258. 1968.

- Shafer, J. G. y Ansfield, J. The effect of rabbit antisera on the ability of Entamoeba histolytica to phagocytose red blood cells. Ann. J. Trop. Med. Hyg. 5: 53. 1956.
- Singh, B. N. Pathogenic and non-pathogenic amoeba. The Macmillan Press LTD. 1a. Edición. 1975.
- Strauss, J. H., Burge, B. W. y Darnell, J. E. Carbohydrate content of the membrane protein of Sind s virus. J. Mol. Biol. 47: 437. 1970.
- Takehuchi, A. y Phillips, P. B. Electron microscopic studies of experimental Entamoeba histolytica infection in the guinea pig. I. Penetration of the intestinal epithelium by trophozoite. Ann. J. Trop. Med. Hyg. 24: 34. 1975.
- Trissl, D.; Martínez-Palomo, A.; De la Torre, M.; y de la Hoz, R. Estudio cuantitativo de la aglutinación selectiva de cepas patógenas de E. histolytica inducida por la concanavalina A. En; Conferencia Internacional Sobre Amibiiasis. Editores B. Sepúlveda y L. S. Diamond. IMSS. Méx. p. 261. 1976.
- Trissl, D.; Martínez-Palomo, A.; De la Torre, M.; De la Hoz, R. y Pérez de Suárez, E. Fagocitosis de eritrocitos humanos por Entamoeba histolytica. Estudio cuantitativo. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 219. 1978.

- Vicent, P. y Neal, R. A. Duration of invasiveness of Entamoeba histolytica maintained in vitro. Parasitol. 50: 449. 1960.
- Visvervara, G. S. y Callaway, C. S. Light and electron microscopic observations on the pathogenesis of Naegleria fowleri in mouse brain and tissue culture. J. Protozool. 27: 239. 1974.
- Weinbach, E. C.; Harlow, D. R.; Takeuchi, T.; Diamond, L. S.; Claggett, C. E. y Kohn, H. Aerobic metabolism of Entamoeba histolytica: Facts and fallacies. En: Conferencia Internacional Sobre Amibiasis. Editores. B. Sepúlveda y L. S. Diamond. IMSS México. p. 190 1976.
- Weinbach, E. C.; Claggett, C. E.; Takeuchi, T. y Diamond, L. S. Biological oxidations and flavoproteins catalysis in Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Méd. (Méx.). 9(Supl. 1): 89. 1978.
- W.H.O. Expert Commite. Amoebiasis. Technical Report Series 421 p. 7. 1969.
- Wilcocks, C. y Manson Bohr, P.E.C. Manson's Tropical Diseases. 17a. Edición Balliere-Tindal. Londres. 1972.
- Wittner, M. y Rosebaun, R. M. Role of bacteria in modifyng virulence of Entamoeba histolytica. J. Trop.Med.Hyg. 19: 755. 1970.

Zaman, V. Ingestion of erithrocytes by Entamoeba. Acta. Trop. 27:
178. 1970.

APENDICE

MEDIO 56 (MINIMO)

KH_2PO_4	13.6 gr
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0 gr
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 gr
CaCl_2	0.01 gr
$\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0005 gr

pH 7.4 en 1000 ml de agua destilada.

MEDIO MINIMO

Tris HCL	6.056	gr
KCl	0.890	gr
Mg Cl ₂ 6H ₂ O	1.626	gr
NaCl	1.462	gr
CaCl ₂	0.22	gr
Ac. ascorbico	1.76	gr
Cisteína	0.78	gr

pH 7 en 1000 ml de agua bidestilada.

MEDIO TY1-S-33

Biosate	30.0	gr
Dextrosa	10.0	gr
NaCl	2.0	gr
KH_2PO_4	0.6	gr
Cisteína	1.0	gr
K_2HPO_4	1.0	gr
Ac. ascórbico	0.2	gr
Citrato Férrico	0.236	gr

pH 6.8 en 820 ml de agua bidestilada

SOLUCION DE ALSEVER

Dextrosa 20.5 gr

Citrato de Sodio 8.0 gr

Acido Cítrico 0.55 gr

NaCl 4.2 gr

pH 6.1 en 1000 ml de agua bidestilada

SOLUCION SALINA AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

NaCl 8.0 gr

KCl 0.2 gr

Na₂HPO₄ 1.15 gr

KH₂PO₄ 0.2 gr

pH 7 en 1000 ml de agua destilada.

TINCION DE NOVIKOFF

Se disuelven 2 mg/ml de diaminobenzidina (Sigma) en una solución amortiguadora de 2 amino-2 metil-propanodiol (5.25 g/1000 ml de agua destilada) con un pH de 9.7 y al momento de usar esta solución se le agrega una gota de H_2O_2 por cada 10 ml de la solución.

La mezcla celular de amibas con eritrocitos, se lava y se fija con glutaraldehído, se desecha el sobrenadante y se le agregan aproximadamente 1 ml de la solución de diaminobenzidina (preparada como anteriormente se menciona), se incuba por 30 min en un baño de agua a 37°C. Posteriormente se lava 3 x con PBS, se desecha el sobrenadante y una gota de esta preparación se coloca en un portaobjetos y se observa al microscopio, para contar los eritrocitos ingeridos o adheridos por amiba.