



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

**ESTUDIO DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE DURANTE EL
CICLO CELULAR DE Entamoeba histolytica EN
CLONAS DE DIFERENTE VIRULENCIA.**

por

JORGE RAMIRO DOMINGUEZ RODRIGUEZ

**Tesis para obtener el grado de Licenciatura
en la carrera de Biología**

Ciudad de México

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Ma. Esther Orozco Orozco, como parte del proyecto : "Localización y expresión de genes de antígenos superficiales de Entamoeba histolytica en un banco de cDNA" subvencionado por el Conacyt.

Durante la realización del trabajo el autor fue becado por las compañías Extractos y Derivados S.A. de C.V. y Avon Cosmetics y por el Conacyt.

Al Creador, que con su infinita misericordia creó las
amas, con lo que nos dio trabajo para poder dar gloria de su
nombre.

A mis Padres, que me dieron amor y apoyo para terminar mis
estudios profesionales.

Con amor para mi Esposa e Hijos (donde quiera que se
encuentren).

A mis hermanos, amigos y colegas.

Mi gratitud a las personas que con su colaboración entusiasta y desinteresada hicieron posible la realización de este trabajo, en especial a:

La Dra. Ma. Esther Orozco Orozco por la dirección y colaboración en este trabajo y por todo el apoyo que me brindó en mi formación académica.

Al M. en C. Fidel de la Cruz Hernández E. por sus atinados consejos y amenas charlas que hicieron más fácil el camino.

Al Biol. Miguel Angel Vargas M. y a la Q. F. B. Rossana Arroyo V. por su asesoría en la realización de los geles de poliacrilamida.

A la Dra. Guadalupe Ortega P. por sus consejos y asesoría en la toma de fotografías de fluorescencia.

A los señores Fernando Medina R. y Gerardo Rivera M. por su colaboración en el laboratorio.

A los señores Catarino Villeda y Jorge Humberto Martínez por la realización de los dibujos.

A la Biol. Norma Pernas Buitrón, al Lic. Arturo Victoria L., al Ing. J. Joaquín Ochoa Palacios y al Médico Víctor Bazán Reséndiz por su comprensión y ayuda incondicional.

A todos los integrantes del laboratorio 8 del Departamento de Genética y Biología Molecular por su diaria convivencia.

A todos mis compañeros del Plan Modular que vivimos esta experiencia juntos.

CONTENIDO

RESUMEN

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

INTRODUCCION

- 1.- Taxonomía y generalidades
- 2.- Morfología
- 3.- Fisiología
- 4.- Ciclo de vida
- 5.- Frecuencia de la amibiasis
- 6.- Problemas en el estudio de E. histolytica
- 7.- Importancia del estudio de antígenos de superficie de E. histolytica
- 8.- Sincronización en Entamoeba histolytica
- 9.- El ciclo celular
- 10.- Estudio del ciclo celular con células individuales
- 11.- Métodos de sincronización celular
- 12.- Metodologías empleadas en el estudio de antígenos de superficie

OBJETIVOS

MATERIALES Y METODOS

- 1.- Cepas de Entamoeba histolytica
- 2.- Tinción de antígenos de superficie con lectinas fluorescentes

- 3.- Sensibilidad de E. histolytica a colchicina
- 4.- Procedimiento de sincronización (clona L-6)
- 5.- Incorporación de timidina tritiada en cultivos sincrónicos
- 6.- Dilución de timidina tritiada en cultivos sincrónicos
- 7.- Pulso y caza de timidina tritiada en cultivos sincrónicos
- 8.- Efecto de la colchicina sobre la síntesis de ADN
- 9.- Cuantificación de material TCA precipitable
- 10.- Tinción de antígenos de superficie a lo largo del ciclo celular de E. histolytica (Clona L-6)
- 11.- Radioyodinación de las proteínas de superficie de E. histolytica (Clona L-6)
- 12.- Preparación de las muestras para electroforesis
- 13.- Preparación de los geles de poliacrilamida
- 14.- Condiciones de corrida electroforética
- 15.- Tinción de los geles
- 16.- Cultivo de la línea celular MDCK
- 17.- Adhesión de los trofozoítos de la clona L-6 a células epiteliales MDCK en el ciclo celular
- 18.- Obtención de eritrocitos humanos
- 19.- Eritrofagocitosis de la clona L-6 en el ciclo celular

RESULTADOS

- 1.- Tinción de trofozoítos de las clonas L-6 y A utilizando lecitinas fluorescentes
- 2.- Sensibilidad de E. histolytica, clona L-6 y A a colchicina
- 3.- Sincronización de cultivos de la clona L-6 de E. histolytica
- 4.- Determinación del tiempo de duración de las fases S + G₂ y de las fases D + G₁ en el ciclo celular de la clona L-6 de Entamoeba histolytica
- 5.- Establecimiento de la duración de la fase D y de la fase G₁ en el ciclo celular de la clona L-6 de E. histolytica

- 6.- Establecimiento de la duración de la fase S y de la fase G₂ en el ciclo celular de la clona L-6 de E. histolytica
- 7.- Efecto del tratamiento con colchicina sobre la síntesis de ADN en la clona L-6 de Entamoeba histolytica
- 8.- Tinción de antígenos de superficie a lo largo del ciclo celular de la clona L-6 de E. histolytica
- 9.- Radioyodinación de las proteínas de superficie a lo largo del ciclo celular de la clona L-6 de E. histolytica
- 10.- Adhesión a células epiteliales de la clona L-6 de Entamoeba histolytica en el ciclo celular
- 11.- Eritrofagocitosis de la clona L-6 de E. histolytica en el ciclo celular

DISCUSIONES

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

RESUMEN

El objetivo general de este trabajo fue realizar un estudio de los antígenos de superficie a lo largo del ciclo celular en dos clonas de diferente virulencia de Entamoeba histolytica, la clona A (virulenta) y la clona L-6 (avirulenta), aisladas ambas a partir de la cepa HM1:IMSS.

El estudio de los antígenos de superficie se realizó mediante el marcaje de superficie de células intactas con lectinas fluorescentes y mediante el marcaje de las proteínas de superficie con ^{125}I para su posterior análisis electroforético. Además se realizaron ensayos de adhesión y fagocitosis a lo largo del ciclo celular de los trofozoítos, por estar estos eventos relacionados probablemente con los antígenos superficiales.

Todos los experimentos se realizaron durante el ciclo celular utilizando cultivos sincrónicos de la clona L-6 inducidos con altas concentraciones de colchicina en el medio de cultivo. La clona A no pudo ser sincronizada por lo que el estudio de sus antígenos de superficie no se llevó a cabo completamente.

Los experimentos parecen sugerir una variación antigénica en el ciclo celular de la clona L-6 demostrada por la tinción con lectinas fluorescentes, el radiomarcaje con ^{125}I y por los ensayos de adhesión y fagocitosis a lo largo del ciclo celular de E. histolytica.

Por otra parte, los resultados también sugieren que los antígenos de la clona A y L-6 son diferentes, ya que los patrones de tinción con Con A, fueron diferentes, comprobando además que la mayoría de los residuos de azúcares en la superficie en ambas clonas son principalmente manosa y glucosa.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucléico
ARN	Acido ribonucléico
T	Tiempo total del ciclo celular
G ₁	Fase Gap 1 del ciclo celular
S	Fase de Síntesis del ciclo celular
G ₂	Fase Gap 2 del ciclo celular
M	Fase de Mitosis del ciclo celular
D	Fase de División
TYI-S-33	Tripticasa, extracto de levadura, hierro-suero Medio de Diamond y col (1978) para cultivo axé- nico para <u>Entamoeba histolytica</u>
Con A	Concanavalina A
WGA	Aglutinina de germen de trigo
UEA	Aglutinina de <u>Ulex europaus</u>
DBA	Aglutinina de <u>Dolichos biflorus</u>
RCA	Aglutinina de <u>Ricinus communis</u>
SBA	Aglutinina de frijol de soya
PNA	Aglutinina de cacahuete
PBS	Solución salina amortiguada de fosfatos
(³ H) tim	Timidina tritiada
TCA	Acido tricloroacético
cpm	Cuentas por minuto
LPO	Lactoperoxidasa
KI	Ioduro de potasio
p-CMB	p-cloromercuribenzoato
NEM	N-etil maleimida
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
SDS	Dodecilsulfato de sodio
B-ME	B-mercaptoetanol
TEMED	N,N,N',N', tetrametiletildiamina

MDCK	Línea de células epiteliales de riñón de perro
P.M.	Peso molecular
Kd	Kilodaltones

LISTA DE TABLAS

- I Afinidad de las lectinas por azúcares
- II Tinción de las clonas A y L-6 de E. histolytica con lectinas fluorescentes
- III Calculo del índice de sincronía en un cultivo de la clona L-6 de E. histolytica tratados con colchicina
- IV Tinción de la clona L-6 de E. histolytica con Con A a lo largo de su ciclo celular

LISTA DE FIGURAS

- 1 Diagrama del porcentaje de mitosis marcadas
- 2 Porcentaje de trofozoítos de las clonas A y L-6 con diferente grado de fluorescencia por tinción directa con Con A
- 3 Efecto de la colchicina sobre el crecimiento de la clona L-6 de Entamoeba histolytica
- 4 Efecto de la colchicina sobre el crecimiento de la clona A de Entamoeba histolytica
- 5 Efecto del inóculo sobre la inducción de la sincronía en la clona L-6 de E. histolytica
- 6 Incorporación de (^3H) tim en cultivos sincrónicos de la clona L-6 de E. histolytica
- 7 Dilución de (^3H) tim en cultivos sincrónicos de la clona L-6 de Entamoeba histolytica
- 8 Incorporación de (^3H) tim en un pulso en cultivos de la clona L-6 de E. histolytica
- 9 Efecto de la colchicina sobre la síntesis de ADN en la clona L-6 de Entamoeba histolytica
- 10 Proteínas totales de la clona L-6 de E. histolytica en diferentes fases del ciclo celular
- 11 Autorradiografía de proteínas de superficie de la clona L-6 de E. histolytica marcadas con ^{125}I en diferentes fases del ciclo celular
- 12 Análisis densitométrico de las proteínas de superficie de la clona L-6 de E. histolytica de diferentes fases del ciclo celular
- 13 Cinética de adhesión a monocapas de células epiteliales de la clona L-6 de E. histolytica a lo largo de su ciclo celular
- 14 Cinética de fagocitosis de eritrocitos humanos de la clona L-6 de E. histolytica a lo largo de su ciclo celular
- 15 Modelo de afinidad de la Con A por receptores de superficie en E. histolytica

INTRODUCCION

1.- TAXONOMIA Y GENERALIDADES

Phylum: Protozoa
Clase: Sarcodina
Subclase: Rhizopoda
Orden: Amoebida
Familia: Endamoebidae
Género: Entamoeba
Especie: Entamoeba histolytica (Shaudin, 1903)

Entamoeba histolytica es el protozoario que parasita al hombre y a otros mamíferos, entre los que destacan los simios, los monos, los cerdos, los perros, los gatos y los roedores (Noble y Noble, 1976). En la mayor parte de los individuos la infección se presenta como un estado de portador asintomático, pero con frecuencia este protozoario es responsable de una enfermedad que puede ir desde la diarrea crónica ligera hasta la disentería fulminante. Existen complicaciones extraintestinales de la amibiiasis; entre las más comunes está el absceso hepático que puede romperse hasta el peritoneo, la pleura, el pulmón, el pericardio y los genitales (Harrison, 1976).

La amiba presenta dos estadios en su ciclo de vida, una fase activa llamada trofozoíto, que es la fase invasiva y responsable de la sintomatología clínica de la enfermedad, y otra latente, denominada quiste, que es la fase infectiva, responsable de la transmisión de la amibiiasis (Burdon y Williams, 1976).

El trofozoíto, al igual que el quiste, es microscópico y mide de 7 a 35 micras de diámetro, no presenta estructuras internas especiales, a excepción del núcleo, numerosas vacuolas y varias inclusiones (Kudo, 1969). Su locomoción es mediante la emisión de pseudópodos. Bajo ciertas condiciones, aún no definidas,

el trofozoíto, puede enquistarse y/o reproducirse, al parecer por fisión binaria (Kudo, 1969; Burdon y Williams, 1976). Su hábitat es el lumen intestinal, produciendo úlceras en la mucosa. Entre las partículas que ingiere se encuentran células tisulares, eritrocitos y leucocitos (Kudo, 1969).

2.- MORFOLOGIA

El citoplasma del trofozoíto en condiciones de cultivo se puede diferenciar en endoplasma granuloso y ectoplasma hialino. Además, la amiba presenta un gran número de vacuolas digestivas cuando se observa recién extraída de algún hospedero (Kudo, 1969). Los estudios de microscopía electrónica no han mostrado mitocondrias, ni aparato de Golgi, ni retículo endoplásmico, ni peroxisomas (Osada, 1959; Miller y col., 1961; Fletcher y col., 1962; Siddiqui y Rudzinska, 1965; Rondanelli y col., 1966, 1967; Griffin y Juniper, 1971; Martínez-Palomo y col., 1976). El núcleo amibiano mide de 4 a 7 micras de diámetro y además presenta vesículas, siendo éstas observables solo en microscopio de contraste de fases (Chávez y col., 1971).

3.- FISILOGIA

La tasa metabólica de la amiba es elevada, por lo tanto consume grandes cantidades de energía, sin embargo al carecer de mitocondrias y citocromos carece también de ciclo de Krebs funcional.

Antaño se creía que las amibas eran anaeróbicas, pero recientemente se demostró que consumen oxígeno cuando se les proporciona (Weinbach y col., 1976). Las investigaciones del metabolismo aeróbico de E. histolytica han mostrado además que los sustratos que oxida son D-glucosa, D-galactosa, etanol, isopropanol, L-serina, NADH y NADPH (Weinbach y col., 1978). Como componentes de la cadena respiratoria se han identificado nucleótidos de nico-

tinamida y adenina, además de compuestos con centro de fierro-azufre (Cervantes, 1980).

4.- CICLO DE VIDA

Aunque el ciclo de vida de E. histolytica dentro del hospedero es desconocido, los experimentos in vitro y las observaciones clínicas e histopatológicas sugieren que el ciclo de vida de este parásito es el siguiente: cuando los quistes son ingeridos por un nuevo hospedero, éstos son llevados al intestino, en donde el trofozoíto escapa del confinamiento de la pared quística (exquistación) (Noble y Noble, 1976). La exquistación comienza con un incremento en la tasa metabólica dentro del quiste. Seudópodos claramente formados a partir del ectoplasma, se pegan rápidamente en diferentes puntos de la periferia del quiste (Noble y Noble, 1976). Frecuentemente los pseudópodos presionan sobre ciertos puntos de la pared quística, hasta que el trofozoíto encuentra la salida, al encontrar el poro de salida, la perforación de la pared se realiza y el trofozoíto sale (Noble y Noble, 1976). Una vez liberados los trofozoítos, éstos pueden pasar al colon e invadir la mucosa intestinal, produciendo úlceras y disentería amibiana. Los trofozoítos pueden atravesar la pared intestinal y por torrente sanguíneo invadir el hígado, el pulmón, el cerebro, el corazón o los genitales, produciendo abscesos (Noble y Noble, 1976; Harrison, 1977).

Se ha calculado que alrededor de 45 millones de quistes son descargados cada día en las heces de una persona infectada (Noble y Noble, 1976), de ahí que los quistes puedan difundirse por medio del agua, el viento, por insectos e inclusive por el hombre.

5.- FRECUENCIA DE LA AMIBIASIS

En un estudio de mortalidad urbana realizado en 1962-1964, por la Oficina Sanitaria Panamericana en diez ciudades latinoamericanas, solo se registraron casos de muertes en residentes de entre 15 y 74 años de edad. El número de fallecimientos debidos a amibiasis fue igual al producido por todas las demás enfermedades infecciosas del tracto digestivo (Puffer y Griffith 1967), además, de 100 muertes registradas por amibiasis, 33 ocurrieron en la Cd. de México.

Las estadísticas de amibiasis basadas en necropsias ofrecen datos de mayor exactitud, pero al mismo tiempo reflejan solamente las formas más graves de esta enfermedad. En los registros del Hospital General de México de la SSA en el año de 1968 se muestra que la amibiasis ocupó el cuarto lugar como causa de muerte en la Cd. de México (Riadura y López, 1968). Y datos más recientes indican que esta parasitosis tiene una incidencia en nuestro país de entre el 2 y el 9 % de la población (Gutierrez y col., 1976).

La amibiasis, además de ser una enfermedad grave capaz de matar al enfermo que la padece en un período relativamente corto, es también un padecimiento crónico que puede inutilizar individuos productivos por períodos de tiempo prolongado con la consecuente repercusión económica y social. En una muestra de 1443 pacientes con absceso hepático, entre los cuales hubo una mortalidad del 17 %, la estancia hospitalaria promedio fue de 48 días, y la incapacidad para el trabajo fue de 80 días como promedio (Sepúlveda, 1964).

6.- PROBLEMAS EN EL ESTUDIO DE E. histolytica.

El parásito fue encontrado por Lösh en 1875, en un paciente del distrito de Arcangel cerca de Peterburgo, quien sufría disentería crónica asociada con la presencia de amibas en las heces.

Aunque estas amibas producían disentería cuando eran inoculadas en perros, Lösh no creyó que el parásito fuera el agente causal de la enfermedad. El papel patogénico de las amibas fue demostrado por Kartulis en 1887 trabajando en Egipto (Martínez-Palomo, 1982), quien además describió la existencia de lesiones hepáticas. Posteriormente hubo trabajos, en su mayoría clínicos, que ayudaron a definir el papel de la amiba en la disentería crónica y en los abscesos hepáticos. Sin embargo el estudio sistemático de la biología de *E. histolytica* ha presentado varios problemas debido esencialmente a la falta, hasta 1968, de un medio de cultivo axénico para trofozoítos (Diamond, 1968). Diez años más tarde este medio fue modificado por Diamond y es en la actualidad el de uso más generalizado (Diamond y col., 1978). No obstante la eficiencia de este medio para el crecimiento de los trofozoítos, tiene la desventaja de ser altamente complejo y las sustancias que lo componen y sus proporciones se desconocen. Esto ha dificultado algunos estudios sobre la biología amibiana.

Otro problema que ha enfrentado el estudio de la amiba en cuanto a su diferenciación celular, ha sido la falta de un protocolo de obtención de quistes de este parásito de manera controlada y definida.

Por otro lado, las cepas obtenidas en el laboratorio a partir de las heces fecales, úlceras colónicas y abscesos hepáticos muestran una gran heterogeneidad celular, según se ha demostrado recientemente (Suárez, 1983; Orozco y col. 1983; 1985). Este problema ha sido parcialmente solucionado con el aislamiento de clonas, utilizando la técnica descrita por Gillin y Diamond (1978). Sin embargo, aún trabajando con clonas, la heterogeneidad de los cultivos amibianos persiste debido a la fisiología propia de cada célula y muy probablemente a la fase del ciclo celular en que se encuentren los trofozoítos.

7.- IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE E. histolytica.

La respuesta inmune en contra de E. histolytica es un tanto complicada, esencialmente por la diversidad de componentes antigénicos que presenta.

En infecciones naturales y experimentales, los antígenos de superficie juegan un papel muy importante, ya que son las primeras moléculas del parásito que tienen contacto directo con el hospedero y es, además, sobre ellas en donde se fijan los anticuerpos inmovilizando temporalmente al trofozoíto y lisándolo en algunos casos (Cole y Kent, 1953).

Los antígenos de superficie son principalmente carbohidratos y glicoproteínas y a pesar de estar parcialmente caracterizados se desconocen hasta la fecha la mayoría de sus funciones. Sin embargo en E. histolytica se han descrito algunas propiedades dinámicas de la superficie que involucran de alguna manera a los antígenos superficiales, una de ellas es la formación de casquete inducida por ligandos polivalentes (Calderón y col., 1980; Trissl y col., 1977).

Los estudios con anticuerpos específicos en la formación de casquete de los antígenos de superficie de E. histolytica, puede utilizarse para tratar de averiguar el papel que juega esta propiedad en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune por este parásito, ya que los anticuerpos al interaccionar con los antígenos de superficie del trofozoíto, son redistribuidos a un punto en la membrana celular del trofozoíto, llamado uroide, para posteriormente liberar o fagocitar los complejos antígeno-anticuerpo (Calderón y col., 1980).

Este proceso celular de formación de casquete involucra, ne cesariamente un recambio antigénico. Este recambio antigénico en la superficie de la amiba, como ya se ha mencionado es inducido por la acción de ligandos polivalentes. Sin embargo, no se sabe si

existe en este parásito un recambio antigénico espontáneo y periódico como se ha descrito en otros parásitos para evadir la respuesta inmune del hospedero a lo largo de su ciclo celular o de su ciclo de vida (Cantrell, 1958; Onyango y col., 1965; Seed, 1972)

Existen evidencias de que trofozoítos de clonas de E. histolytica no virulentas presentan una velocidad de formación de casquete significativamente menor que las clonas de mayor virulencia (Olguín, 1964). Estos datos podrían sugerir alguna relación de este fenómeno con la agresividad de los trofozoítos.

8.- SINCRONIZACION EN Entamoeba histolytica

El ciclo celular de E. histolytica aún no ha sido establecido. Los primeros intentos por sincronizar trofozoítos de E. histolytica se llevaron al cabo empleando un método inductivo con choques térmicos, que consiste en el enfriamiento prolongado de los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento (Cervantes, 1980). Este método se utilizó debido a que con él se logró la sincronización exitosa en amibas de vida libre como Amoeba proteus (James, 1959, 1966). Con esta técnica también se había logrado la sincronización mitótica en amibas del género Naegleria (Fulton y Guerrini, 1963). No obstante los resultados que se obtuvieron en E. histolytica con este método fueron variables, produciéndose además una destrucción abundante de los trofozoítos (Cervantes, 1980).

Recientemente, se han intentado sincronizar los cultivos amibianos utilizando bloqueadores de la síntesis del ADN como la hidroxíurea. Sin embargo, la viabilidad de los trofozoítos obtenida con este método es muy baja, debido a lo tóxico de la droga (Austin y Warren, 1983).

9.- EL CICLO CELULAR

El ciclo celular es el período entre la formación de una nueva célula por la división de su célula madre y el tiempo en que la nueva célula se divide para formar dos células hijas. Es una unidad fundamental de tiempo, y a nivel celular, se define como el ciclo de vida de una célula (Mitchison, 1973). En la mayoría de las células animales, el mayor tiempo del ciclo es ocupado por la interfase, que es el período de tiempo entre la división celular y el comienzo de la siguiente mitosis.

Dos tipos diferentes de eventos ocurren en un ciclo celular normal. Uno de ellos incluye los eventos de mitosis y estrangulación celular, los cuales son procesos de separación espacial. El otro incluye eventos de síntesis, en los cuales se duplican esencialmente todos los componentes de la célula. Para estudiar los patrones de crecimiento y síntesis a través del ciclo celular se han utilizado dos principales metodologías. Una de ellas consiste en trabajar con células individuales mediante técnicas de medición microscópica. Esta metodología tiene la ventaja de revelar con detalle fino los patrones de crecimiento y la variación entre células individuales, la desventaja es que su medición es estrictamente limitada. En el segundo tipo se encuentran las metodologías que utilizan cultivos sincrónicos, donde los cultivos celulares han sido puestos en una misma fase de crecimiento. El gran mérito de los cultivos sincrónicos, es que ellos proveen suficiente material homogéneo para estudios bioquímicos. Sin embargo la sincronía de los cultivos no es completa, ya que la fase de división ocurre en un período de tiempo más o menos largo. Además, después de algunos ciclos los cultivos pierden su sincronía, debido a la variación del tiempo del ciclo entre célula y célula (Burnet-Hall y Waugh, 1967; Cook y James, 1964; Engelberg, 1964).

Existen dos grupos amplios de procedimiento de sincronización:

a) La sincronización por selección, en la cual las células en un estadio particular del ciclo son seleccionadas a partir de un cultivo asincrónico y crecidas posteriormente en un cultivo por separado; y

b) La sincronía por inducción, en la cual se aplican tratamientos específicos a los cultivos que pueden sincronizar a las células en una fase específica del ciclo celular.

Los ciclos después de una sincronía por selección al parecer son normales, ya que los procedimientos de sincronía por selección no afectan al metabolismo celular, produciéndose ciclos celulares normales en cuanto al tiempo de duración. Algunos tipos de sincronía por inducción también producen ciclos celulares normales, pero algunos métodos distorsionan los ciclos. Por ejemplo múltiples choques térmicos con calor producen excelente sincronía en Tetrahymena pero los ciclos celulares son más cortos y además las células son más grandes y varían mucho más en tamaño que en cultivos no sincrónicos (Scherbaum y Zeuthen, 1954).

El uso temporal de bloqueadores, por ejemplo de la síntesis de ADN o de la mitosis, detienen a las células en la fase de síntesis del ADN o de división, pero pueden no sincronizar a las células en otros aspectos del metabolismo, como lo es la síntesis de proteínas, del ARN, etc. (Mueller, 1969; Mitchison y col. 1969).

10.- ESTUDIO DEL CICLO CELULAR CON CELULAS INDIVIDUALES

a) Aislamiento de una sola célula. El método más directo es el de aislar una sola célula y seguir su crecimiento através de uno o más ciclos haciendo mediciones sucesivas de una forma en que no se dañe la célula (Prescott, 1955; Mitchison, 1957).

b) Distribución por edad e índice mitótico. Una buena forma de obtener información acerca del ciclo celular puede ser por medio de

observaciones o mediciones sobre una serie de células individuales en cultivos asincrónicos. Como por ejemplo, la proporción de células en las que se observen mitosis (índice mitótico). Obviamente la proporción entre células en mitosis y las que no lo están será diferente y siempre se presentarán más células jóvenes que principien el ciclo que células viejas. Esto es debido a que una célula individual vieja, siempre dará dos células jóvenes al pasar por división. Una estimación gruesa de la longitud del período del ciclo celular puede ser calculada utilizando las proporciones de las células en mitosis (Cook y James, 1964).

e) Distribución de componentes celulares. El conocimiento de la edad de las células hace posible predecir la proporción de la can- tidad de un componente celular dado, de un cultivo en crecimiento, y permite conocer además los patrones de incremento de este componente a través del ciclo celular. Por ejemplo, el ADN puede medirse en un número de células tomadas de un cultivo asincrónico en fase exponencial de crecimiento. Con los datos obtenidos es po- sible construir un histograma de frecuencias y a partir de éste una curva promedio de síntesis se pueda derivar por el método des- crito por Walker (1954). Este método es el mejor para construir curvas de síntesis de ADN y permite establecer la duración del ciclo celular.

d) Mitosis marcadas. Uno de los métodos más utilizados para determinar las fases del ciclo celular ha sido el registro de mitosis marcadas en muestras sucesivas de células. Esta técnica fue descrita previamente por Quastler y Sherman (1959) y modificada posteriormente por Howar y Pelc (1963). La descripción más reciente es la de Van't Hof en 1968. En esencia el método consiste en dar un pulso de timidina tritiada in vivo o in vitro a un cultivo asincrónico y tomar muestras de células a varios intervalos de tiem-

po, contando posteriormente el número de mitosis marcadas en una autorradiografía. En las primeras muestras, no se encontrarán mitosis marcadas pero la proporción de las mitosis marcadas aumentará debido a las células que estuvieron en fase de síntesis (S) durante el pulso con timidina tritiada y que hayan pasado a mitosis (M), posteriormente el porcentaje de mitosis marcadas en las muestras disminuirá debido a que ya no hubo incorporación de timidina tritiada en estas células, porque no se encontraban en síntesis (S) durante el pulso radioactivo.

El promedio de duración de la fase S es tomado como el tiempo entre los dos puntos de la primera cresta en que ocupa 50 % las mitosis marcadas. El tiempo entre el comienzo del experimento y el primer punto de 50 % de mitosis marcadas se toma como el tiempo de duración de la fase gap 2 (G_2) más la mitad de la mitosis (M) (Fig. 1). Se toma la mitad de M porque hasta el primer punto de 50 % de mitosis marcadas se registra también la profase que generalmente se lleva la mitad del tiempo de mitosis (Mitchison, 1973).

11.- METODOS DE SINCRONIZACION CELULAR

I Sincronía por selección.

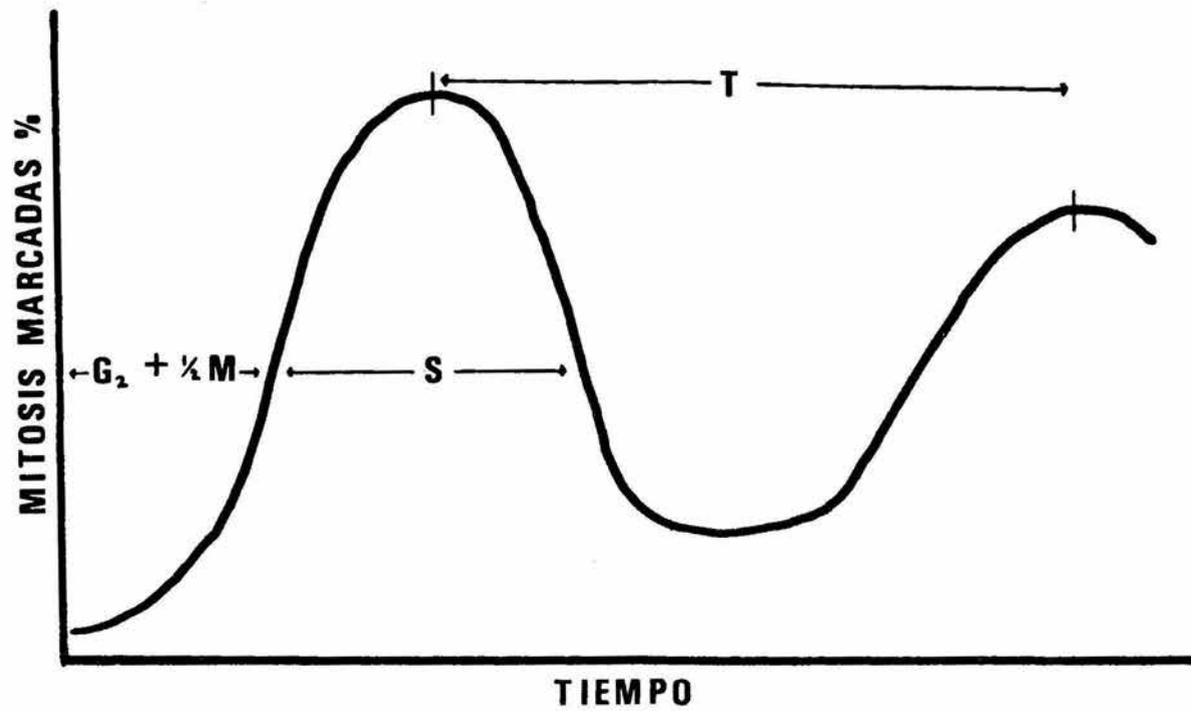
a) Lavados. Este método se basa en que las células en estado mitótico están menos adheridas al sustrato en que están creciendo, por lo que pueden ser removidas por un simple lavado. Este método fue usado por primera vez por Terasima y Telmach (1961; 1963) en células He la.

b) Separación en gradiente. Mitchison y Vincent. (1965) desarrollaron este método que se basa en que las células presentan diferentes densidades de acuerdo a la fase del ciclo celular en que se

FIGURA 1

Diagrama del porcentaje de mitosis marcadas

Diagrama de mitosis marcadas en metafase en muestras sucesivas de células después de un pulso de timidina tritiada. T= tiempo total del ciclo celular, S= fase de síntesis del ADN, M= mitosis, G₁= fase gap1 del ciclo celular y G₂= fase gap 2 del ciclo celular (Tomado de Mitchison, 1973).



encuentren, pudiendo ser separadas en un gradiente de sacarosa.

II Sincronía por inducción.

a) Inhibidores de la síntesis de ADN. Xeros (1962) encontró que altas concentraciones de timidina detenían la síntesis de ADN en células de mamífero mediante una inhibición enzimática. La fluro-deoxiuridina bloquea la síntesis de nucleótidos y fue probada con éxito por Rueckert y Mueller (1960) y por Littlefield (1962). El metrotrexate un antagonista del ácido fólico fue usado por Rueckert y Mueller (1960) y por Mueller y Kajiwara (1966).

El 5-aminouracil fue usado en células vegetales por Smith y col. (1963) y Wagenarr (1966) y en células He la por Reagan y Chu (1966).

Todas estas sustancias tienen la propiedad de detener el crecimiento por la inhibición de la síntesis de ADN permitiendo sincronizar los cultivos celulares.

b) Inhibidores de metafase. La colchicina, y la colchemida, un derivado de la colchicina menos tóxico, bloquea a las células en metafase, inhibiendo la polimerización de microtubulos en la mitosis, siendo este efecto reversible mediante el retiro de la droga.(Doida y Okada, 1967).

Otro agente reversible que bloquea a las células en metafase sincronizando los cultivos es el oxido nitroso (Rao,1968). La vinblastina es otro bloqueador pero es difícilmente reversible en células de mamífero (Marcus y Robbins, 1963).

12.- METODOLOGIAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE.

Para el estudio de antígenos de superficie se han desarrollado técnicas de marcaje con anticuerpos monoclonales u otros li-

gandos específicos del tipo lectina, las cuales son proteínas y glicoproteínas de origen no inmune, que se unen a carbohidratos de manera específica, aglutinando células y/o precipitando complejos de carbohidratos (polisacáridos, glicoproteínas, glicolípidos etc.). Los ligandos (anticuerpos o lectinas) se encuentran acoplados a alguna marca radioactiva o fluorescente para su reconocimiento. Esto ha permitido establecer el número de receptores sobre la superficie celular o su distribución celular con técnicas de microscopía, debido a la especificidad que presentan estos ligandos.

Las lectinas o los anticuerpos inmovilizados en una columna de afinidad permiten aislar y purificar a estos antígenos superficiales. Estas técnicas, con anticuerpos monoclonales y lectinas son ampliamente utilizadas en otros sistemas además de en Entamoeba histolytica (Holder y Freman, 1982).

Otra técnica utilizada comunmente, es el marcaje de las proteínas de superficie de las células in vivo, es decir la radioyodación de las proteínas mediante la lactoperoxidasa como catalizador enzimático, este método se basa en la sustitución de los radicales libres de la tirosina de las proteínas de superficie por iodo radioactivo (^{125}I). Este tipo de marcaje permite hacer análisis electroforéticos de las proteínas de superficie mediante el uso de técnicas autorradiográficas (Freman y Holder, 1983).

Todas estas técnicas han permitido estudios no solo a nivel inmunológicos, sino también a nivel bioquímico y de biología molecular y han ayudado a entender ciertos mecanismos de diferenciación celular en otros sistemas. En E. histolytica estas técnicas han servido en estudios de antigenicidad de diferentes cepas ambientales, pero las perspectivas de investigación en este campo con la ayuda de estas técnicas pueden ser amplias.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue el de estudiar de manera general los antígenos de superficie en dos clones de diferente virulencia de E. histolytica, así como el cambio que sufren estos antígenos a lo largo del ciclo celular de este parásito.

Objetivos particulares.

- a) Determinar la afinidad de varias lectinas a la superficie de diferentes clones de E. histolytica.
- b) Sincronizar los cultivos amibianos y establecer el tiempo de duración de las diferentes fases del ciclo celular de E. histolytica.
- c) Establecer la afinidad de las lectinas en diferentes fases del ciclo celular de E. histolytica.
- d) Determinar si existe variación antigénica en el ciclo celular de E. histolytica mediante marcaje de superficie con ^{125}I .
- e) Determinar si existe variación en el grado de adhesión y fagocitosis en el ciclo celular de E. histolytica.

MATERIALES Y METODOS

1.- CEPAS DE Entamoeba histolytica

Trofozoítos de E. histolytica de las clonas L-6 y A (Grosce 1981) que fueron obtenidas a partir de la cepa HM1:IMSS (de la Torre y col., 1971), se cultivaron axénicamente a 37° C en medio TYI-S-33 (Diamond y col., 1978) suplementado con suero de ternera (Biocel, México) al 16 % y 2 % de la mezcla especial de vitaminas de Diamond (North American Biologicals), además se agregaron penicilina (42 U/ml de medio) y estreptomicina (6 ug/100 ml de medio) (Lakeside, México).

Los cultivos fueron sembrados en fase logarítmica de crecimiento, utilizando tubos de borosilicato de 16 x 125 mm con tapa de rosca. Los trofozoítos se despegaron del tubo incubandolos en un baño de agua-hielo durante 5 minutos, y agitandolos posteriormente. De la suspensión amibiana fría se tomó un inóculo de 0.1 a 0.3 ml dependiendo de la densidad celular del cultivo, para sembrar en tubos con medio nuevo. Los cultivos alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento cuando el tubo presentó una concentración celular de 1×10^5 a 1.5×10^5 amibas/ml de medio.

2.- TINCION DE ANTIGENOS SUPERFICIALES CON LECTINAS FLUORESCENTES

Con el objetivo de buscar diferencias entre las proteínas de membrana en las diferentes clonas amibianas se utilizaron como marcadores de superficie las siguientes lectinas: concanavalina A (Con A) que tiene especificidad por manosa y glucosa; aglutinina de germen de trigo (WGA) que tiene especificidad por N-acetil glucosamina; aglutinina de Ulex europaeus (UEA) que presenta afinidad por L-fucosa; aglutinina de Dolichos biflorus (DBA), de Ricinus communis (RCA) y aglutinina de frijol de soya (SBA), que presentan especificidad por N-acetil galactosamina y aglutinina de cacahuate (PNA) que tiene especificidad por galactosa (todas las lectinas fueron adquiridas de Vector Laboratories Inc.)(Tabla I).

La afinidad de las lectinas por la membrana amibiana se probó en concentraciones de 25, 50 y 100 ug/ml de las diferentes lectinas disueltas en solución salina de fosfatos amortiguada (PBS) pH 7.2 adicionándole además cloruro de calcio (Baker) y cloruro de magnesio (Baker), los dos en una concentración final de 1 mM.

Una suspensión amibiana de aproximadamente 1×10^6 trofozoítos/tubo (12 ml) en fase logarítmica de crecimiento se centrifugó a 4° C a 360 x g. El sobrenadante se descartó y el paquete se lavó por centrifugación en 10 ml de PBS pH 7.2 a 4° C, estéril y adicionado con CaCl_2 y MgCl_2 1mM. El paquete se resuspendió finalmente en 0.7 ml del mismo amortiguador, tomándose alícuotas de 0.1 ml y colocándolas en tubos eppendorff de 1 ml. Los tubos se incubaron inmediatamente en agua-hielo (0° C) y posteriormente se les agregó 0.1 ml de la solución de las diferentes lectinas, un tubo por cada lectina. Los tubos con las amibas y las lectinas, se agitaron para lograr una adecuada interacción entre la superficie de los trofozoítos y los ligandos, posteriormente se incubaron a 0° C por 20 minutos, agitando los tubos por inversión cada 5 minutos. Al término de la incubación, los tubos se centrifugaron a 0° C a 360 x g 5 minutos, el sobrenadante se descartó y el paquete celular se fijó con paraformaldehído (Sigma) al 4 % durante 30 minutos a temperatura ambiente, agitando los tubos por inversión cada 10 minutos. Por último se hicieron preparaciones en portaobjetos que se observaron en un microscopio de fluorescencia (Polivar) para obtener el porcentaje de células teñidas para cada lectina y en cada clona amibiana, repitiéndose la operación en cada una de las concentraciones a probar.

3.- SENSIBILIDAD DE E. histolytica A COLCHICINA

10^4 trofozoítos fueron inoculados en tubos con 12 ml de medio TII-S-33 a los que se les agregó 10, 100 y 200 ug de colchicina por ml de medio (Sigma). El número de células fue contado cada 24 horas en los tubos, que fueron sembrados por duplicado.

TABLA I

Afinidad de las lectinas por azúcares

TABLA I

LECTINA	ORIGEN	AFINIDAD
WGA	Germen de trigo	N-acetil neuramínico N-acetil glucosamina
PNA	Cacahuete	D-galactosa
UEA	<u>Ulex europaus</u>	L-fucosa
DBA	<u>Dolichos biflorus</u>	N-acetil galactosamina
RCA	<u>Ricinus communis</u>	N-acetil galactosamina
SBA	Frijol de Soya	N-acetil galactosamina
Con A	<u>Canavalia ensiformis</u>	manosa y glucosa

4.- PROCEDIMIENTO DE SINCRONIZACION (CLONA L-6)

Cultivos amibianos en fase logarítmica de crecimiento se in cubaron en una concentración final de colchicina de 200 ug/ml durante 30 horas a 37° C. Al término de la incubación las amibas se lavaron dos veces por centrifugación a 360 x g con PBS, estéril a 4° C y pH de 7.2. El paquete lavado se resuspendió en medio TYI-S-33 fresco e inmediatamente después se contaron las células y se sembraron en tubos con un inóculo inicial de 10⁴ ó 10⁵ para seguir su cinética de crecimiento. Tubos con un mismo inóculo de amibas sin tratamiento con colchicina fueron sembrados en forma simultánea como control. La población celular se contó cada 4 horas y los experimentos se realizaron 3 veces independientemente. Posteriormente se procedió a calcular el índice de sincronía según la técnica descrita por Blumenthal y Zahler (1962).

5.- INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA EN CULTIVOS SINCRONICOS

Después del tratamiento con colchicina, 10⁵ amibas se sembraron en tubos con medio TYI-S-33 fresco con timidina tritiada (³H) tim (Amersham, 103 Ci/mmol) en una concentración de 5 uCi/ml. Cada 4 horas un tubo se centrifugó a 360 x g y el paquete se lavó dos veces con PBS estéril, a 4° C y pH de 7.2. El paquete se ajustó en PBS a una concentración celular de 5 x 10⁴ amibas/ml. Posteriormente se cuantificó la radioactividad incorporada en el ADN por célula, pasando un ml de la suspensión amibiana a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.45 micras de poro (Millipore HA) y precipitando a los trofozoítos in situ con ácido tricloroacético (TCA) (Merck) al 5 %. La cinética de incorporación se siguió por duplicado, midiendo el número de cuentas por minuto (cpm) por célula en material TCA precipitable, y cuantificando el número de trofozoítos en cada punto de la curva de crecimiento.

6.- DILUCION DE TIMIDINA TRITIADA EN CULTIVOS SINCRONICOS

Las amibas se incubaron 30 horas con colchicina (200 ug/ml), agregando además al medio (^3H) tim (7 uCi/ml). Al término de la incubación con colchicina, se sembraron en medio TTI-S-33 fresco, amibas a un inóculo de 5×10^4 trofozoítos por tubo cuantificando el material TCA precipitable por célula, y midiendo simultáneamente el crecimiento en el cultivo amibiano cada 4 horas, para verificar la dilución de la marca en los cultivos en cada división sincrónica.

7.- PULSO Y CAZA DE TIMIDINA TRITIADA EN CULTIVOS SINCRONICOS

Después del tratamiento con colchicina (200 ug/ml por 30 horas), los trofozoítos fueron sembrados simultáneamente en 30 tubos con medio a un inóculo inicial de 1×10^5 amibas. A partir de la hora 0 y en cada hora siguiente, un tubo (de los 30 sembrados) se sometió a un pulso de dos horas. La incorporación en el ADN de la (^3H) tim se midió, cuantificando el material TCA precipitable por célula.

8.- EFECTO DE LA COLCHICINA SOBRE LA SINTESIS DE ADN

Con el objeto de verificar si la colchicina tenía efecto sobre la síntesis de ADN, ésta se midió por incorporación de (^3H) tim (7 uCi/ml) en el ADN durante la incubación con colchicina (200 ug/ml por 60 horas), cuantificando el número de cpm en material TCA precipitable por célula cada 8 horas, y siguiendo el crecimiento amibiano simultáneamente, partiendo de un inóculo inicial de $1 \times 10^5 = 10^5$.

9.- CUANTIFICACION DE MATERIAL TCA PRECIPITABLE

Un ml de suspensión amibiana ajustada a una concentración determinada previamente se pasó a través de un filtro de nitrocelulosa tipo HA de 0.45 micras de poro y de 25 mm de diámetro utilizando vacío. Inmediatamente después, se precipitó el material biológico in situ con 3 ml de TCA al 5% (4°C) por dos veces conse-

cutivas, posteriormente se pasaron 3 ml de etanol al 90 % (Baker) y por último otro volumen igual de etanol absoluto. Los filtros se secaron al aire y se colocaron en viales con 5 ml de líquido de centelleo, el cual se preparó con 4 g de omnifluor (New England Nuclear) en 700 ml de tolueno (Baker) y 300 ml de tritón-X-100 (Sigma). La radioactividad inespecífica pegada al filtro se contó pasando en las mismas condiciones 1 ml de sobrenadante libre de células. Los viales con los filtros se pusieron a 4° C y en obscuridad durante 24 horas antes de su conteo en un espectrómetro de centelleo líquido Packard modelo Tri-carb.

10.- TINCION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE A LO LARGO DEL CICLO CELULAR DE E. histolytica (CLONA L-6)

Una vez establecidas las condiciones de sincronización de los cultivos amibianos, se procedió a realizar la tinción de los antígenos de superficie de la clona L-6 de E. histolytica a lo largo de su ciclo celular. Las lectinas que dieron tinción negativa se descartaron y solo se utilizó la Con A en una concentración de 100 ug/ml, siguiendo el protocolo de tinción antes mencionado, tomando alícuotas para realizar los ensayos en cada hora a lo largo del ciclo celular de los trofozoítos.

11.- RADIOYODINACION DE LAS PROTEINAS DE SUPERFICIE DE E. histolytica (CLONA L-6)

La radioyodinación se realizó mediante la adaptación de A-vila (1982) al método de Marchalonis y col. (1971). La técnica consistió en cosechar a los trofozoítos de la clona L-6 de E. histolytica en diferentes fases del ciclo celular y lavarlos dos veces con PBS estéril y a 4° C adicionado con CaCl₂ y MgCl₂ 1 mM mediante centrifugación a 360 x g por 5 minutos. El paquete se re-suspendió en PBS estéril y a 4° C y pH 7.2 a una concentración de 1 x 10⁷/ml, y se tomó una alícuota de 0.3 ml conteniendo 3 x 10⁶ trofozoítos, posteriormente se depositó en un tubo de vidrio si-

liconizado que contenía 1 mCi de Na^{125}I (Amersham, 14.5 mCi/ug de I) neutralizado volumen a volumen con HCl (Merck) 0.1 N en PBS 2X, ioduro de potasio (KI) (Sigma) para dar una concentración final de 2.7×10^6 M y lactoperoxidasa (LPO) (Sigma) en una concentración final de 100 ug/ml de PBS, completando el volumen final de la mezcla a 1 ml con PBS. La mezcla se incubó inmediatamente en baño-hielo y se hicieron dos adiciones de 25 ul de peróxido de hidrógeno al 0.03 % (Baker) en PBS con un intervalo entre cada una de ellas de 2.5 minutos y con agitación constante durante ese lapso de tiempo. Al término de la segunda adición de peróxido de hidrógeno, la suspensión se pasó a un tubo cónico de plástico estéril, que contenía 15 ml de KI 0.1 M a 4°C (Disuelto en PBS), lavando los trofozoítos en esa solución por centrifugación a $360 \times g$ para retirar la radioactividad inespecífica. El paquete fue utilizado para obtener proteína total y correr la muestra en electroforesis. Las proteínas de superficie, marcadas con ^{125}I se detectaron por contacto del gel con una película para rayos X (Kodak). La autoradiografía se analizó posteriormente en un densitómetro de barrido Gilford. Este procedimiento se realizó en diferentes fases del ciclo celular de trofozoítos de E. histolytica (clona L-6) de un cultivo sincronizado.

12.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS

Los trofozoítos previamente marcados con ^{125}I se resuspendieron en 0.5 ml de PBS estéril a 4°C , conteniendo p-cloromercurobenzoato (p-CMB) y N-etilmaleimida (NEM) en una concentración cada uno de 1 mM en un tubo eppendorff. Posteriormente se congelaron y descongelaron a las células 4 veces en acetona-hielo seco, con el objeto de romper a las células y finalmente se agregó deoxicolato de sodio (Sigma) a una concentración final de 2 % y se dejó reposar el tubo a temperatura ambiente por 20 minutos. Al término de los 20 minutos, se precipitó la proteína total con un

ml de acetona (Merck) y se agitó fuertemente en Vortex, centrifugándose posteriormente el tubo a 12, 000 x g en una centrífuga eppendorff durante 15 minutos a 4° C. El sobrenadante se retiró para repetir el procedimiento dos veces más y el precipitado cetónico final se secó al vacío (Avila, 1982). Estos polvos cetónicos se disolvieron en 100 ul de amortiguador para muestra de electroforésis que contenía los siguientes reactivos: Tris-HCl (Sigma) 0.0625 M a pH 6.3, dodecil sulfato de sodio (SDS) (BDH) al 2.3 %, glicerol (Merck) al 10 %, azul de bromofenol (Bio-rad) al 0.001 %. Una vez disueltas las muestras, se sometieron a ebullición durante tres minutos para inactivar a las proteasas, posteriormente se añadió B-mercaptoetanol (B-ME) (Sigma) a una concentración final del 5 %, las muestras se sometieron nuevamente a ebullición en baño maría por un minuto, con el objeto de disociar completamente a las proteínas en sus componentes polipeptídicos.

13.- PREPARACION DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA

El análisis electroforético se llevó a cabo en geles de poliacrilamida-SDS al 10 %, según el método descrito por Laemmli (1970) modificado (Avila, 1982), en geles planos de 18 x 15 cm con un espesor de 1.5 mm.

El gel resolutivo se preparó a las siguientes concentraciones finales de reactivos; 10 % de acrilamida (Bio-rad), 0.26 % de N,N'-bis-metilen-acrilamida (Bio-rad), 0.54 M de Tris-HCl pH 8.8, glicerol al 10 %, 0.1 % de SDS, 0.05 % de persulfato de amonio (Bio-rad) y 0.03 % de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) (Bio-rad). Para cada gel se empleó un volumen de 32 ml de mezcla.

El gel concentrador se preparó con: 3 % de acrilamida, 0.08 % de N,N'-bis-metilen-acrilamida, 0.1 M de Tris-HCl pH 6.8, 0.1 % de SDS, 0.001 % de persulfato de amonio y 0.05 % de TEMED. Para cada gel se utilizó un volumen de 8 ml de la mezcla.

14.- CONDICIONES DE CORRIDA ELECTROFORETICA

El buffer del electródo contenía: Tris-HCl 0.025 M, glicina 0.16 M (Sigma) y SDS al 0.1 %, con un pH de 8.3. El gel fue pre-corrido toda la noche a una corriente constante de 10 miliamperios al día siguiente se depositaron las muestras en los pozos del gel en un volumen equivalente a 100,000 cpm y se aplicó una corriente constante de 15 miliamperios hasta que el azul de bromofenol migró aproximadamente hasta un cm antes del extremo inferior del gel.

15.- TINCION DE LOS GELES

La tinción de los geles se realizó con azul de Coumassie (Bio-rad). Las proteínas se fijaron en el gel en una solución de TCA al 50 % (V/V) durante 20 minutos. Posteriormente, las proteínas se tiñeron durante toda la noche con azul de Coumassie al 0.25 % en 45 % (V/V) de metanol y 10 % (V/V) de ácido acético (Merck). Finalmente los geles se destiñeron con una solución de metanol al 30 % (V/V) y ácido acético al 10 % (V/V), hasta que las bandas de proteína se observaron claramente. En todas las etapas de la tinción, los geles se sometieron a agitación suave para el mejor recambio de las soluciones.

16.- CULTIVO DE LA LINEA CELULAR MDCK

Las células de la línea MDCK fueron cultivadas en medio Eagle (Gibco), suplementado con 10 % de suero de ternera (Gibco) y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 ug/ml). Las células se sembraron a altas densidades en multicámaras (Limbro). Se dejaron crecer incubándolas a 37° C en atmósfera de CO₂ y aire (5:95 %) y se utilizaron entre 3 y 5 días después de la siembra. Esto es, cuando las monocapas presentaron confluencia.

17.- ADHESION DE LOS TROFOZOITOS DE LA CLONA L-6 A CELULAS EPITELIALES MDCK EN EL CICLO CELULAR

Cultivos amibianos tratados previamente con colchicina para sincronizarlos, se cosecharon en diferentes horas a lo largo de su ciclo celular y se lavaron los trofozoitos con solución salina (NaCl al 0.9 %) (Baker) y se ajustaron a 1×10^5 células/ml de medio TYI-S-33. Por otra parte, las monocapas de células MDCK se lavaron 2 veces antes de cada experimento con solución salina para retirar las células no adheridas. Las células epiteliales se fijaron antes de cada experimento con glutaraldehído al 2.5 % (en PBS) (Merck) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se lavaron 5 veces con solución salina, 2 veces con glicina 1M y 10 veces más con solución salina.

En cada pozo de las multicámaras se agregó 1 ml de la suspensión, y éstas se incubaron a 37° C. A los 20 minutos de incubación, se agregó 1 ml de glutaraldehído al 2.5 % (en PBS) por 30 minutos a temperatura ambiente para fijar la suspensión celular. Los sobrenadantes de los pozos conteniendo los trofozoitos no adheridos se pasaron a tubos cónicos. Cada pozo se lavó 2 veces consecutivas con solución salina para recoger aquellos trofozoitos que no estuvieran adheridos a las monocapas. Las soluciones de lavado se pasaron a los tubos cónicos con los sobrenadantes conteniendo los trofozoitos no adheridos recogidos previamente. Los trofozoitos se centrifugaron y el paquete se resuspendió en 0.5 ml de solución salina y se contaron los trofozoitos en un fotomicroscopio de contraste de fases (Zeiss II) con la ayuda de un hematocímetro. La eficiencia de adhesión se calculó contando el número de trofozoitos no adheridos, restándolo al número de trofozoitos totales que se agregaron a cada monocapa de células, dividiendo este resultado entre el número de trofozoitos totales y multiplicando por 100.

$$\frac{\text{EFICIENCIA TROFOZOITOS TOT. - TROFOZOITOS SUELTOS}}{\text{DE ADHESIÓN} = \frac{\text{TROFOZOITOS TOTALES}}{\text{TROFOZOITOS TOTALES}} \times 100}$$

Los experimentos se realizaron por duplicado, dos veces independientemente.

18.- OBTENCIÓN DE ERITROCITOS HUMANOS

Los eritrocitos fueron obtenidos por punción venosa mediante jeringas estériles con solución Alsever (Garvey y col. 1977) como anticoagulante. La muestra de sangre se pasó a un tubo de 16 x 125 mm, y se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos para separar los eritrocitos del plasma. Posteriormente los eritrocitos se lavaron 3 veces con solución salina y se resuspendieron en medio TYI-S-33 sin suero a una concentración de 1×10^8 eritrocitos/ml. Para todas las pruebas de fagocitosis se utilizaron eritrocitos de no más de 5 días de extraídos.

19.- ERITROFAGOCITOSIS DE LA CLONA L-6 EN EL CICLO CELULAR

Las pruebas de eritrofagocitosis fueron realizadas de acuerdo a la técnica descrita por Trissl y col. (1978). Los tubos de cultivo en diferentes horas del ciclo celular se incubaron cinco minutos en agua hielo para despegar los trofozoitos de las paredes del tubo. Se centrifugaron durante 5 minutos a 360 x g y se ajustaron en medio TYI-S-33 a una concentración de 1×10^6 trofozoitos/ml. 0.4 ml de esta suspensión se puso en contacto con 0.4 ml de la suspensión de eritrocitos humanos frescos (1×10^8 eritrocitos/ml). Los tubos con las suspensiones celulares se incubaron en baño maría a 37° C durante 10 minutos. Al término de los 10 min. se agregaron 10 ml de agua bidestilada a temperatura ambiente y se dejó reposar el tubo por 5 minutos para lisar los eritrocitos no ingeridos. Las preparaciones se centrifugaron a 360 x g, el so

brenadante se descartó y la pastilla se fijó con glutaraldehído al 2.5 % (en PBS) por 30 min. a 37° C. Posteriormente las preparaciones se lavaron 3 veces con solución salina y los eritrocitos ingeridos se contrastaron con la tinción de Novikoff (1972), la cual consiste en incubar las preparaciones durante 30 minutos a 37° C con 3-3' diaminobencidina (Sigma). Al término de este tiempo las preparaciones se lavaron 3 veces con solución salina. Posteriormente se contaron los eritrocitos ingeridos en 100 amibas elegidas al azar y se obtuvieron los promedios de eritrocitos ingeridos en cada una de las horas del ciclo celular de la clona L-6 de E. histolytica.

RESULTADOS

1.- TINCION DE TROFOZOITOS DE LAS CLONAS L-6 y A UTILIZANDO LECTINAS FLUORESCENTES

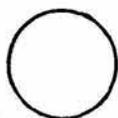
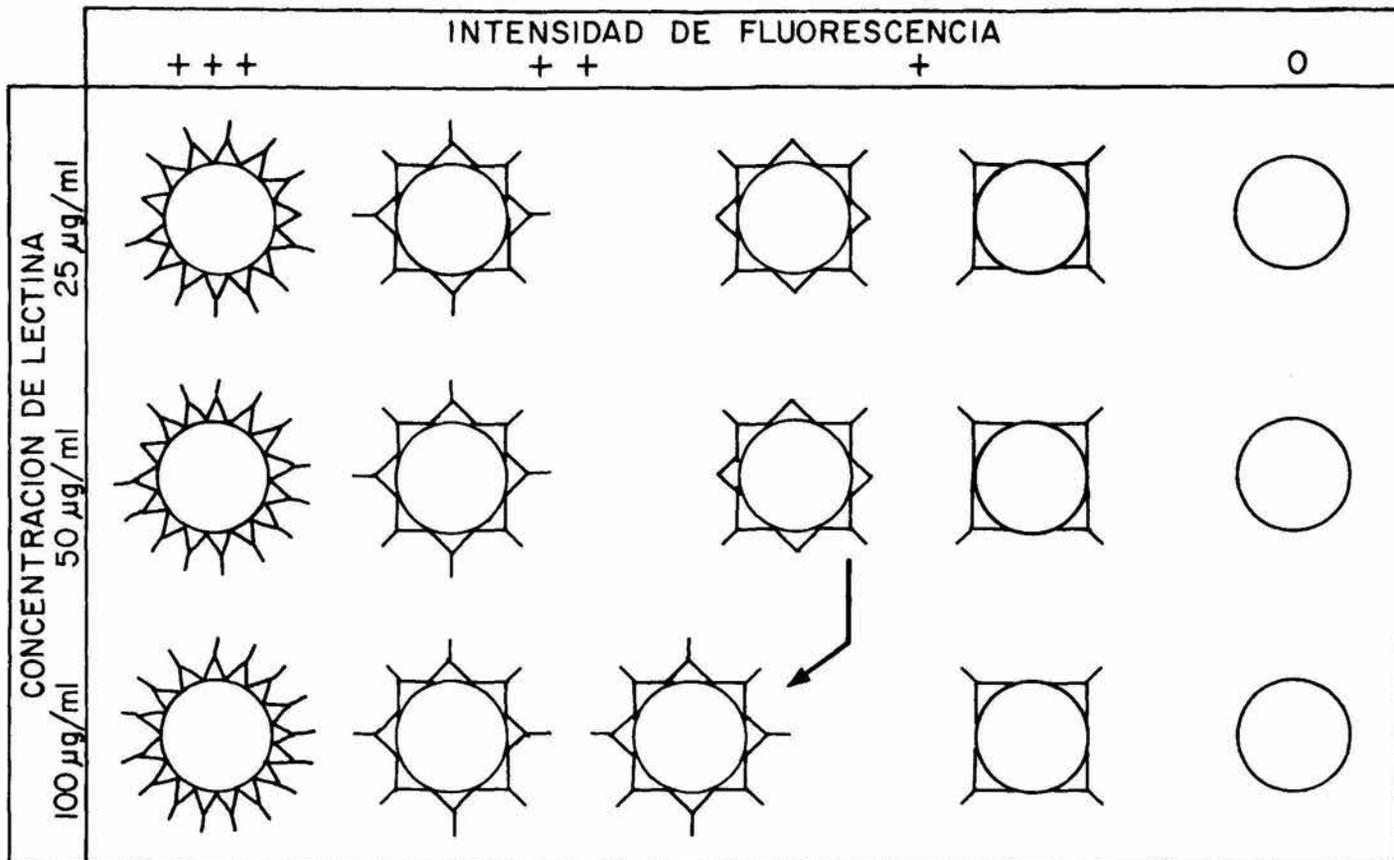
La tinción de los trofozoitos con lectinas fluorescentes se llevó a cabo por incubación de éstos con las lectinas marcadas, observándose directamente al microscopio. Arbitrariamente se clasificaron las células teñidas en a) intensamente fluorescentes (3), b) medianamente fluorescentes (2), c) de fluorescencia baja (1), y d) de fluorescencia nula (0). De las lectinas utilizadas (Tabla I), solamente la Con A tiñó la superficie amibiana en las concentraciones probadas tanto en la clona L-6 como en la A (Tabla II).

25 y 50 ug/ml de Con A dieron en la clona L-6 patrones de tinción similares. Las células con fluorescencia baja ocuparon el mayor porcentaje (59.8 % y 64 % respectivamente). Sin embargo, cuando se utilizaron 100 ug/ml de lectina, se observó una disminución en el porcentaje de células con fluorescencia baja de aproximadamente un 50 % (25.6 %), mientras que el porcentaje de células de fluorescencia media aumentó aproximadamente al doble (de 30.4 % a 62.4 %).

La tinción de la clona A presentó porcentajes de tinción diferentes a los de la clona L-6 (Fig. 2). Con 25 y 50 ug/ml de lectina, el mayor porcentaje de células presentó fluorescencia baja (95 % y 86.2 % respectivamente), mientras que con 100 ug/ml de Con A, el porcentaje de células con baja fluorescencia disminuyó aproximadamente un tercio (64.8 %), aumentando el porcentaje de células con fluorescencia media en casi 5 veces (de 5.8 % a 26.7 %).

En la clona L-6 y A los porcentajes de células con fluorescencia nula y alta fueron muy pequeños manteniéndose constantes en las tres concentraciones de lectina utilizadas.

Estos resultados indican que la superficie celular de los



AMIBA



RECEPTOR PARA
CONCAVALINA A

I CONCAVALINA A

TABLA II

Tinción de las clonas A y L-6 de
E. histolytica con lectinas fluorescentes.

Trofozoítos de E. histolytica de la clona A y L-6 se incubaron con lectinas fluorescentes por 20 minutos a 0° C. Al término de la incubación, las amibas se fijaron con paraformaldehído al 4 % a temperatura ambiente por 30 minutos y posteriormente se observaron al microscopio de fluorescencia.

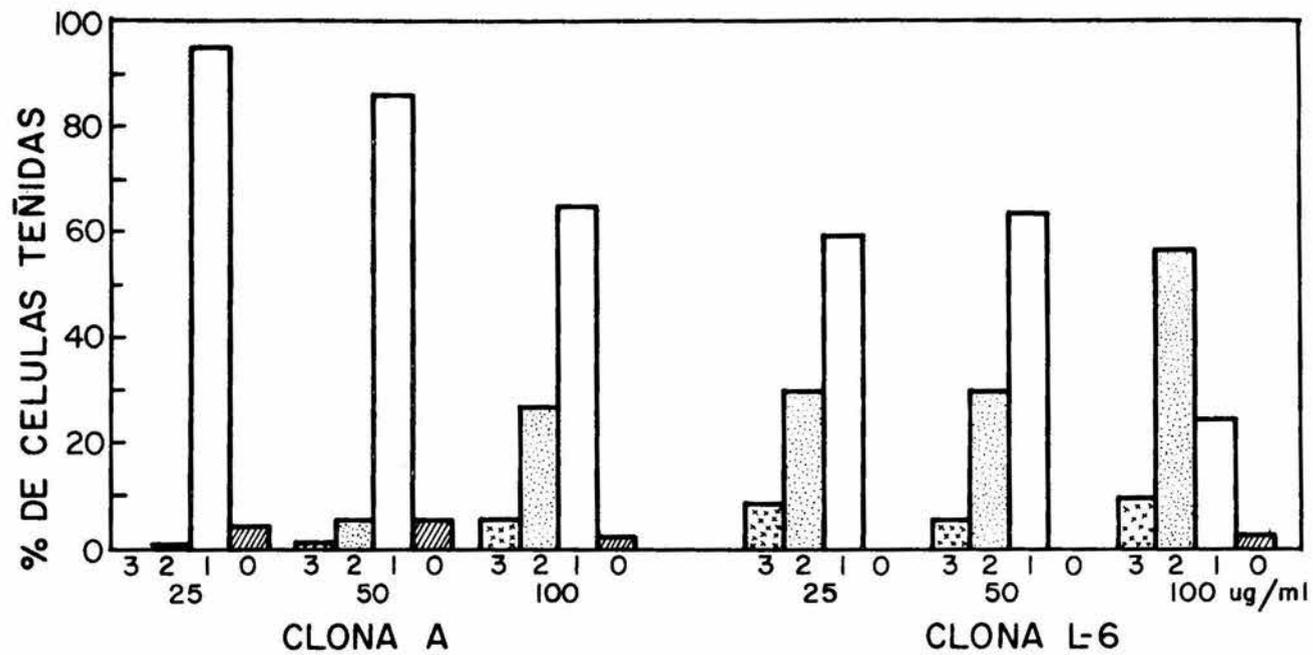
TABLA II

LECTINA	TINCION
WGA	-
FNA	-
UEA	-
DBA	-
RCA	-
SBA	-
Con A	+

FIGURA 2

Porcentaje de trofozoítos de las clonas A y L-6 con diferente grado de fluorescencia por tinción directa con Con A.

Trofozoítos de E. histolytica de las clonas A y L-6 se incubaron con 25, 50 y 100 ug/ml de Con A por 20 minutos a 0° C. Al término de la incubación, las amibas se fijaron con paraformaldehído al 4 % a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se observaron al microscopio de fluorescencia, clasificando la tinción en fluorescencia alta (3), fluorescencia media (2), fluorescencia baja (1) y fluorescencia nula (0).



trofozoítos de la clona A (virulenta) y L-6 (avirulenta de E. histolytica es rica en residuos de manosa y glucosa, y que N-acetil neuramínico, N-acetil glucosamina, N-acetil galactosamina, D-galactosa y L-fucosa no se encuentran expuestas en la superficie de los trofozoítos, o bien se encuentran en cantidades tan pequeñas que no es posible detectarlos con un método de tinción fluorescente como el de las lectinas.

Por otra parte la Con A si fue capaz de definir diferencias entre las clonas A y L-6, al menos en cuanto a la cantidad o la constante de afinidad de los residuos de manosa y/o glucosa por la Con A, ya que los porcentajes de Tinción en ambas clonas fueron muy diferentes.

2.- SENSIBILIDAD DE E. histolytica, CLONA L-6 Y A A COLCHICINA

Con el objeto de saber si la colchicina podría utilizarse como un inductor de sincronía en E. histolytica, se determinó su efecto sobre el crecimiento de los trofozoítos de la clona L-6 y A, los trofozoítos se incubaron en medio de cultivo con diferentes concentraciones de colchicina. Los trofozoítos mostraron en general una alta resistencia a la colchicina, la clona L-6 solo presentó inhibición en el crecimiento a una concentración de colchicina de 200 ug/ml (Fig. 3). Esta dosis inhibe el crecimiento de los trofozoítos de la clona L-6 después de 24 horas de incubación y la viabilidad celular no se ve afectada después de 120 horas de presencia del fármaco en el medio. A 10 y 100 ug/ml de colchicina el crecimiento de la clona L-6 fue muy parecido al control sin colchicina, observándose solo una ligera baja en la velocidad de crecimiento con 100 ug/ml.

La clona A al someterse al mismo procedimiento utilizado con la clona L-6, presentó una mayor resistencia a la droga, por lo que fue necesario aumentar la concentración de la colchicina hasta 600 ug/ml, sin que se pudiera obtener una inhibición en el crecimiento y una buena viabilidad de los trofozoítos. Con 100 y

FIGURA 3

Efecto de la colchicina sobre el crecimiento
de la clona L-6 de Entamoeba histolytica

10^4 trofozoítos se inocularon en tubos con medio de cultivo a los que se les agregó 10 ug/ml (e), 100 ug/ml (a) ó 200 ug/ml (o) de colchicina y como control se inocularon los trofozoítos en medio sin colchicina (a). El número de células en los tubos se contó cada 24 horas.

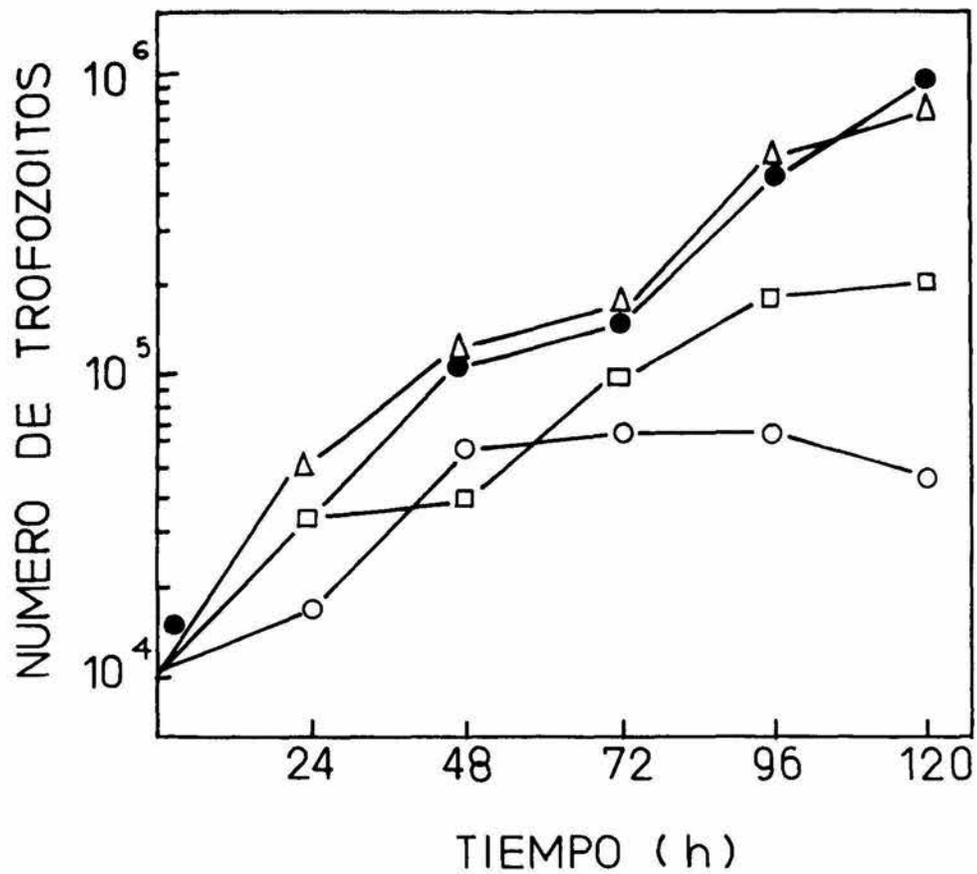
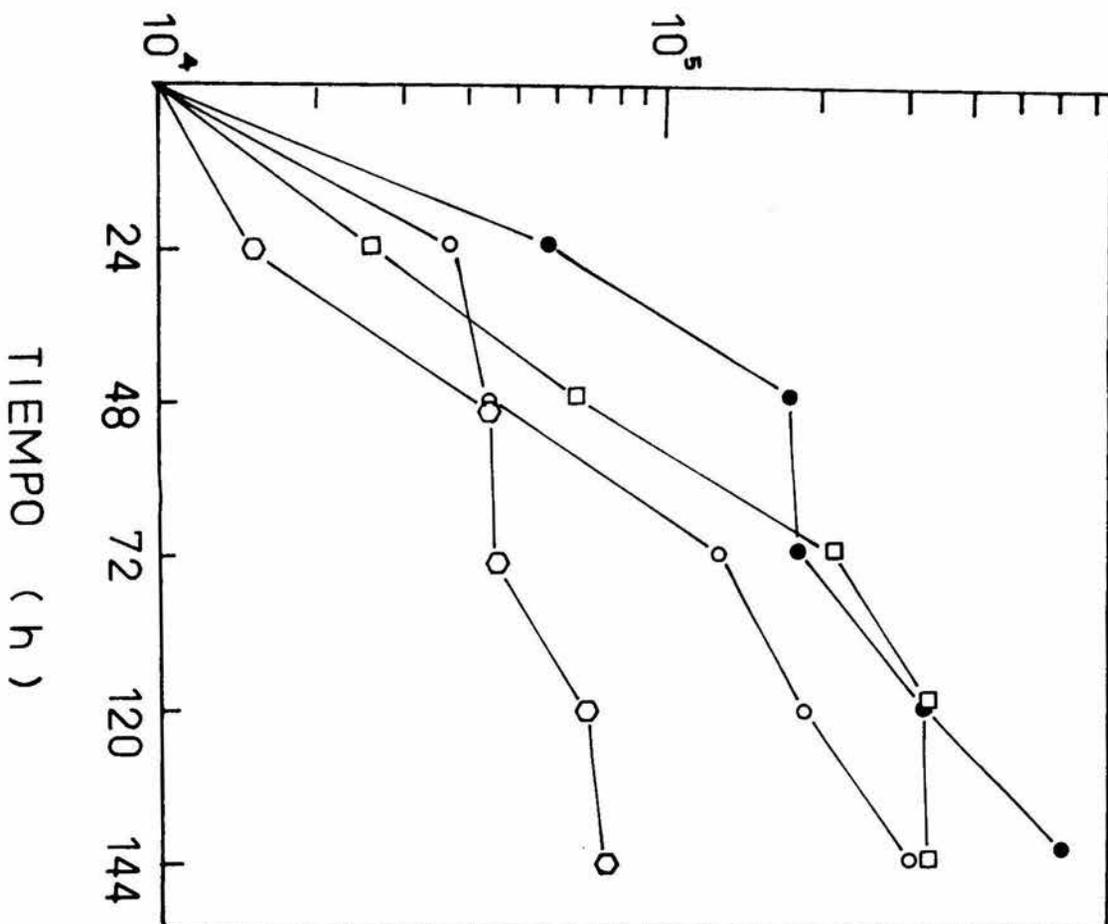


FIGURA 4

**Efecto de la colchicina sobre el crecimiento
de la clona A de Entamoeba histolytica**

10^4 trofozoítos se inocularon en tubos con medio de cultivo a los que se les agregó 100 ug/ml (v), 200 ug/ml (o) y 600 ug/ml (O) de colchicina y como control se inocularon trofozoítos en medio sin colchicina (Δ). El número de células en los tubos se contó cada 24 horas.

NUMERO DE TROFOZOITOS.



200 ug/ml de colchicina el crecimiento de la clona A fue similar al control sin colchicina (Fig. 4).

La sensibilidad de la clona L-6 a la colchicina permitió utilizar a este fármaco como un inhibidor del crecimiento de los trofozoítos, induciendo sincronía al retirar la colchicina, sin embargo en la clona A no fue posible utilizar a la colchicina como un inductor de sincronía ya que los trofozoítos presentarían una mayor resistencia a la droga.

3.- SINCRONIZACION DE CULTIVOS DE LA CLONA L-6 DE E. histolytica

Trofozoítos de la clona L-6 de E. histolytica se incubaron por diferentes tiempos en medio TYI-S-33 con 200 ug/ml de colchicina para determinar el tiempo óptimo de incubación para sincronizar los cultivos. La mejor sincronía se estableció después de 30 horas de incubación con la droga, observándose además que el grado de sincronía también es afectado por el tamaño del inóculo inicial de siembra. 10^5 trofozoítos tratados con colchicina por 30 horas sembrados en tubos con 12 ml de medio, fue la concentración óptima para lograr la sincronía del cultivo (Fig. 5). Bajo estas condiciones, la sincronía se mantuvo hasta en tres ciclos replicativos de aproximadamente 15 horas cada uno de ellos, con un índice de sincronía de 0.93, 0.91 y 0.69 respectivamente (Tabla III) según el modelo de Blumental y Zahler (1962).

El establecimiento de las condiciones de sincronización en la clona L-6 permitió determinar el tiempo de duración de su ciclo celular y de cada una de sus fases.

FIGURA 5

Efecto del inóculo sobre la inducción
de la sincronía en la clona L-6 de E. histolytica .

Trofozoítos de la clona L-6 de E. histolytica se incubaron en medio TII-S-33 con 200 ug/ml de colchicina por 30 horas. Al término de la incubación 10^4 y 10^5 trofozoítos se sembraron en tubos con medio fresco y el crecimiento celular se midió cada 4 horas. (■) 10^4 trofozoítos control, (●) 10^4 trofozoítos tratados con colchicina, (□) 10^5 trofozoítos control, (○) 10^5 trofozoítos tratados con colchicina.

NUMERO DE TROFOZOITOS

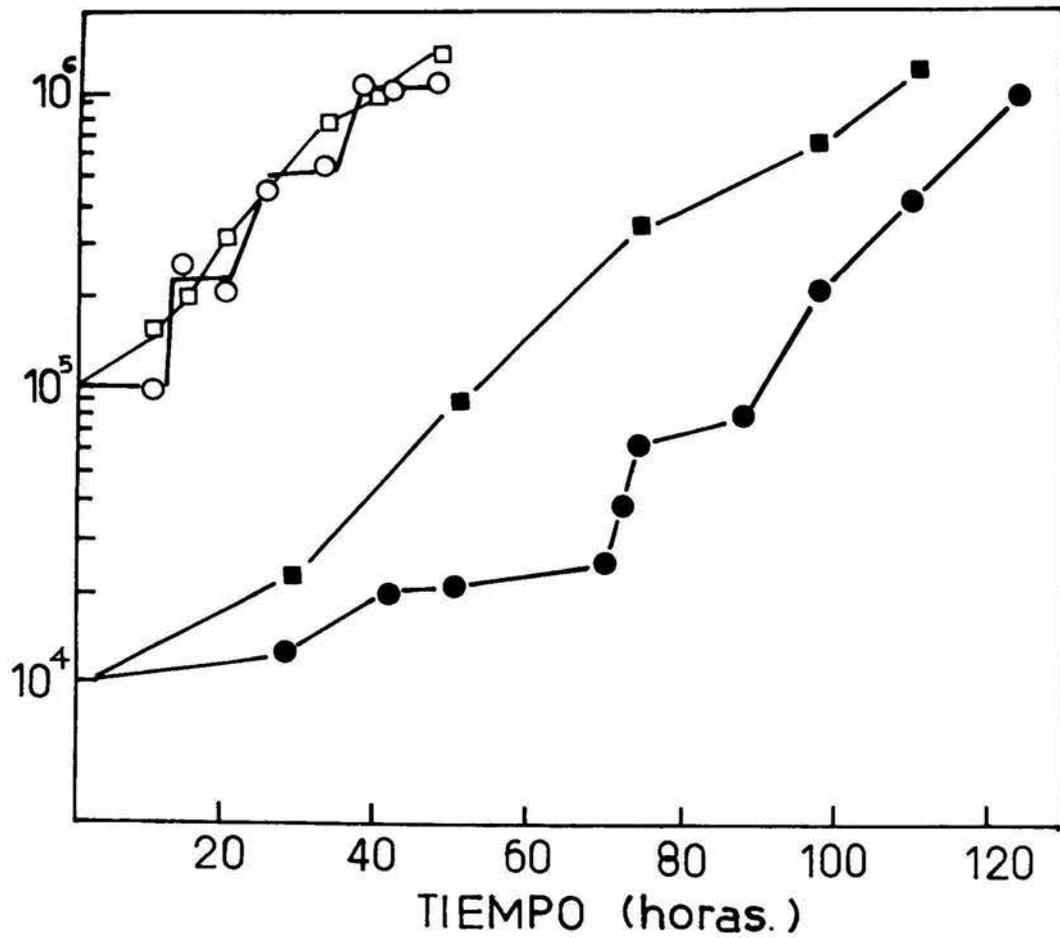


TABLA III

Cálculo del índice de sincronía en un cultivo de la clona L-6 de E. histolytica tratados con colchicina

10^5 trofocitos de la clona L-6 de E. histolytica incubados previamente por 30 horas en medio con 200 ug/ml de colchicina se sembraron en tubos con medio fresco, el crecimiento celular se midió cada 4 horas y el índice de sincronía se calculó en cada división sincrónica del cultivo de acuerdo al modelo descrito por Blumental y Zahler (1962) $(N_2/N_1) \cdot 2^{t/g}$. Donde N_1 = número de células a un tiempo 1, N_2 = número de células a un tiempo 2, t = tiempo entre t_1 y t_2 (h), y g = tiempo de generación (h) (10 horas para E. histolytica).

TABLA III

DIVISION	N_1	t_1	N_2	t_2	t	SUSTITUCION $(N_2/N_1) \cdot 2^{t/8}$	INDICE DE SINCRONIA
1a.	13×10^4	hora 10	27×10^4	hora 12	2h	$(27 \times 10^4 / 13 \times 10^4) \cdot 2^{2/8}$	0.93
2a.	27×10^4	hora 21	6×10^5	hora 25	4h	$(6 \times 10^5 / 27 \times 10^4) \cdot 2^{4/8}$	0.91
3a.	6×10^5	hora 35	12×10^5	hora 39	4h	$(12 \times 10^5 / 6 \times 10^5) \cdot 2^{4/8}$	0.69

4.- DETERMINACION DEL TIEMPO DE DURACION DE LAS FASES S + G₂ Y DE LAS FASES D + G₁ EN EL CICLO CELULAR DE LA CLONA L-6 DE Entamoeba histolytica

Con el fin de establecer que parte del ciclo celular ocupa la fase de síntesis de ADN, es decir si se encontraba antes de la división celular, como en cualquier ciclo celular normal y de esta forma dividir el ciclo celular de la clona L-6 en dos periodos, uno de síntesis de ADN y otro caracterizado por la ausencia de ella. Para esto, después del tratamiento con colchicina los trofozoítos de la clona L-6, fueron sembrados en medio TYI-S-33 fresco suplementado con (³H) tim para marcar metabólicamente el ADN ambiente a lo largo de su crecimiento sincrónico.

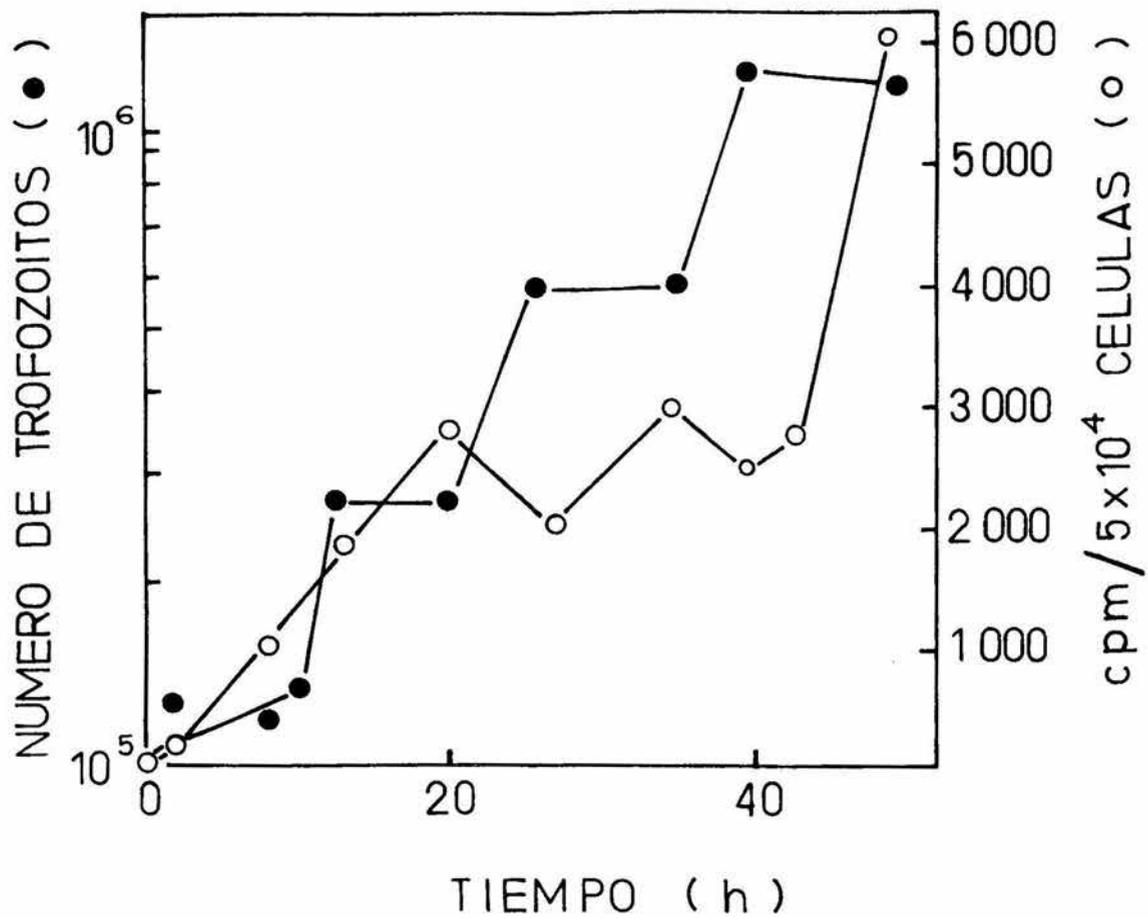
La incorporación de (³H) tim por célula, medida por el número de cpm en material TCA precipitable, junto con el monitoreo del número celular demostró que en el momento de la división celular, las cpm por célula disminuyeron significativamente (Fig.6) Sin embargo esta disminución solo se observó en la 2a. y 3a. divisiones sincrónicas, ya que en la 1a. división sincrónica la incorporación de (³H) tim fue continua después del tratamiento con colchicina.

Usando los datos del segundo ciclo replicativo, es decir, de la hora 11 a la 26, fue posible dividir el ciclo celular en dos períodos: uno antes de la división de 9 horas (de la hora 11 a la 20), que corresponde a la síntesis de ADN (S) y a la fase gap 2 (G₂) y otro de 6 horas (de la hora 20 a la 26), que incluye a la división celular (D) y a la fase gap 1 (G₁). Lo anterior sugiere que los trofozoítos de la clona L-6 de Entamoeba histolytica tienen un ciclo celular que presenta las cuatro fases características en un ciclo celular normal, faltando determinar solamente la duración de cada una de ellas.

FIGURA 6

Incorporación de (^3H) tim en cultivos sincroniz
cos de la clona L-6 de E. histolytica

10^5 trofozoitos tratados con colchicina por 30 horas en una concentración de 200 ug/ml fueron sembrados en tubos con medio TYI-S-33 conteniendo 5 uCi/ml de (^3H) tim. El número de células y la incorporación de la marca en el ADN amibiano por célula se cuantificaron simultaneamente cada cuatro horas.



5.- ESTABLECIMIENTO DE LA DURACION DE LA FASE D Y DE LA FASE G₁ EN EL CICLO CELULAR DE LA CLONA L-6 DE E. histolytica.

En otros experimentos, las amibas fueron incubadas con (³H) tim durante el tratamiento con colchicina y la dilución de la marca por célula fue seguida a través del crecimiento sincrónico de la clona L-6 de E. histolytica para tratar de determinar el tiempo necesario para la división celular y discernirla del tiempo de duración de la fase G₁ en el ciclo celular.

La Fig. 7 muestra que la duplicación celular es inducida al término de la primera hora después de haber sido removida la colchicina, lo anterior definió que el segundo período de 6 horas (mencionado anteriormente) y que incluye tanto la división celular (D), como la fase G₁, puede ser dividido en una hora correspondiente a la fase D y en 5 horas, inmediatamente anteriores a la síntesis de ADN, correspondiente a la fase G₁.

La Fig. 7 muestra además que en cada división sincrónica, existe una duplicación en el número celular de la población y una dilución en la marca de alrededor del 50 % en las cpm por célula, sugiriendo un tipo de división binaria en la mayoría de la población celular.

6.- ESTABLECIMIENTO DE LA DURACION DE LA FASE S Y DE LA FASE G₂ EN EL CICLO CELULAR DE LA CLONA L-6 DE E. histolytica.

Para estudiar el tiempo de duración de la fase S, se midió el tiempo de incorporación de (³H) tim por célula en un cultivo sincrónico, en un experimento de pulso y caza (Fig. 8). La gráfica muestra que no existe síntesis de ADN, en las primeras 5 horas después de la 1a. división, correspondientes a la fase G₁, sino que la síntesis se inicia en la hora 6 y termina en la hora 12 después de la división, lo que nos indica que la fase S del ciclo celular de la clona L-6 dura aproximadamente 6 horas, esto permite dividir el período de 9 horas antes mencionado en uno de 6 horas

FIGURA 7

Dilución de (^3H) tim en cultivos sincrónicos
de la clona L-6 de Entamoeba histolytica

5×10^4 trofozoítos incubados previamente por 30 horas en medio TYI-S-33 con 200 ug/ml de colchicina y 7 uCi/ml de (^3H) tim se sembraron en tubos y la dilución de la marca por célula en cada división sincrónica se siguió al mismo tiempo que se monitoreaba el crecimiento celular en todo el experimento.

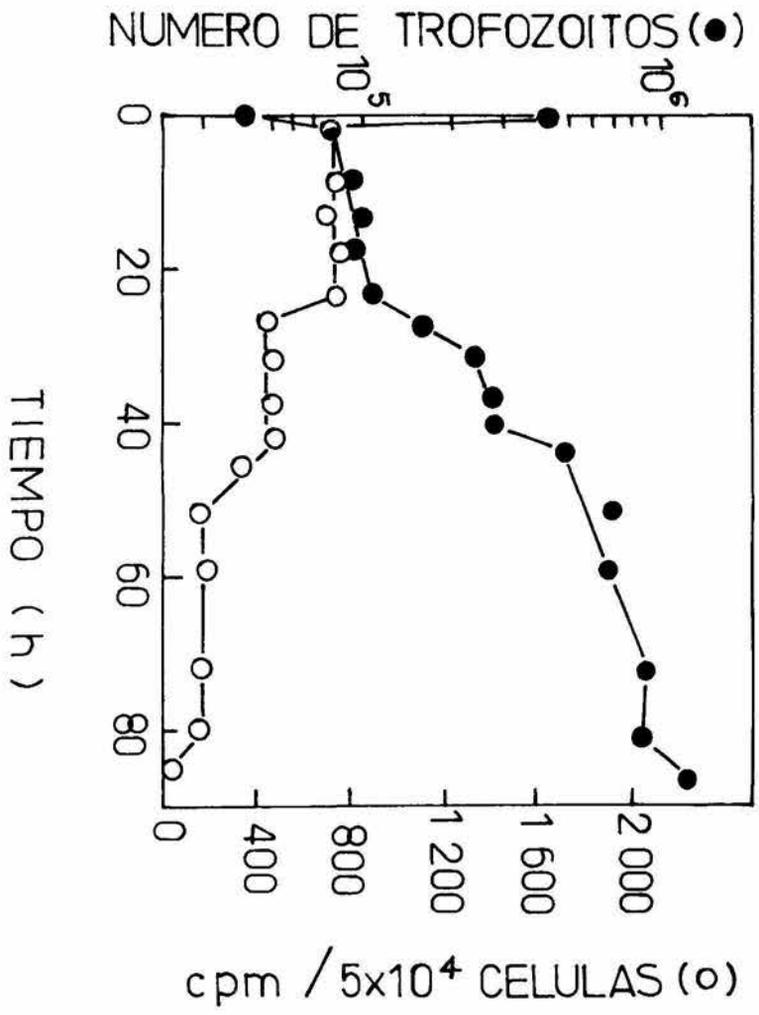
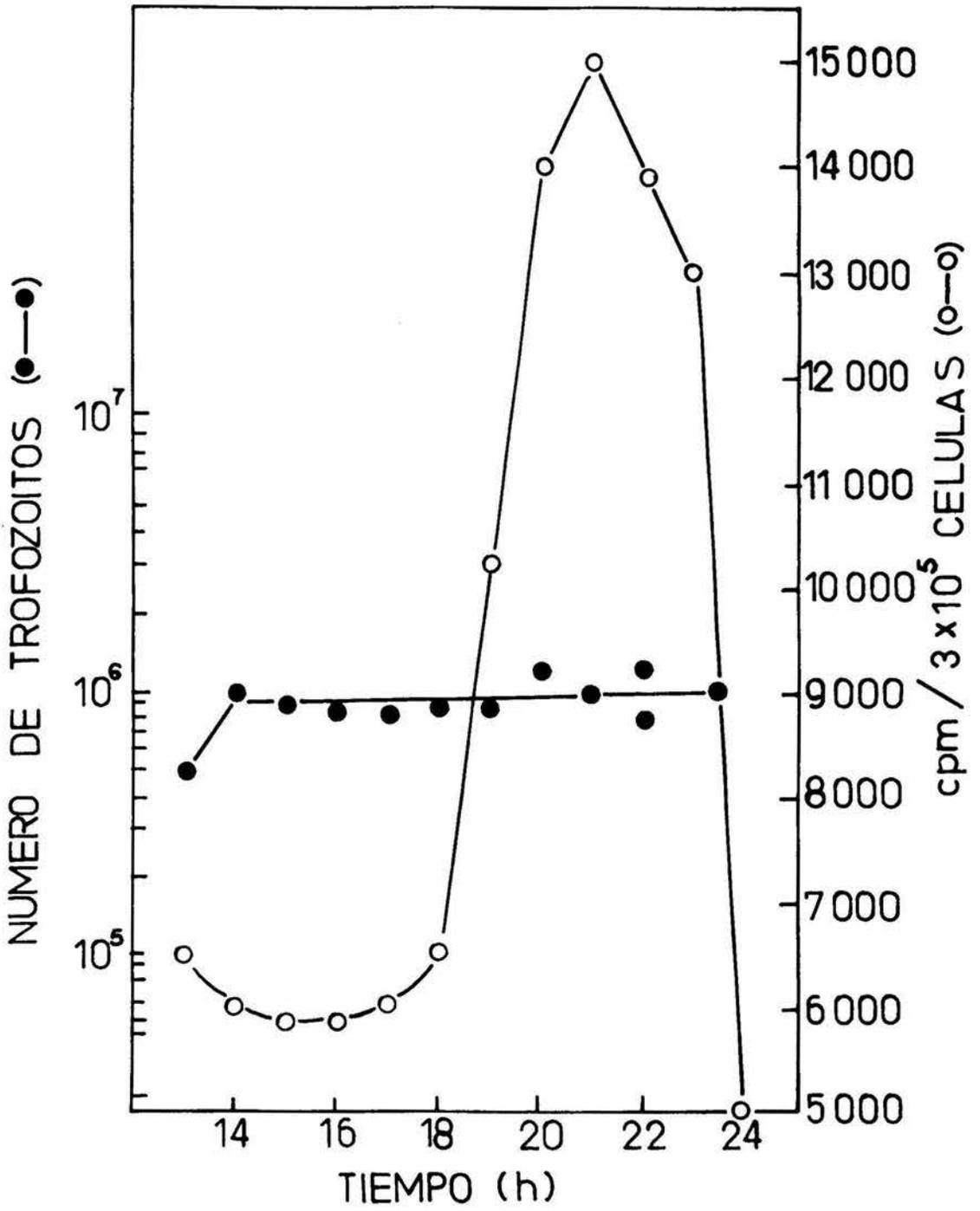


FIGURA 8

Incorporación de (^3H) tim en un pulso en
cultivos sincrónicos de la clona L-6 de E. histolytica

10^5 trofozoítos de la clona L-6 tratados con colchicina fueron sembrados en tubos con medio TII-S-33. A partir de la hora 0, cada tubo se sometió a un pulso de 12 uCi/ml de (^3H) tim de dos horas. Al término del pulso se cuantificó la síntesis de ADN ambiente por célula en material TCA precipitable.



y otro de 3 correspondientes a la fase S y G₂ respectivamente.

Los datos permiten además establecer que el tiempo de síntesis de ADN, al menos en la clona L-6 es un evento discreto y que le sigue una fase gap antes de la siguiente división celular como ocurre en el ciclo celular de la mayoría de los sistemas biológicos.

7.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON COLCHICINA SOBRE LA SINTESIS DE ADN EN LA CLONA L-6 DE Entamoeba histolytica

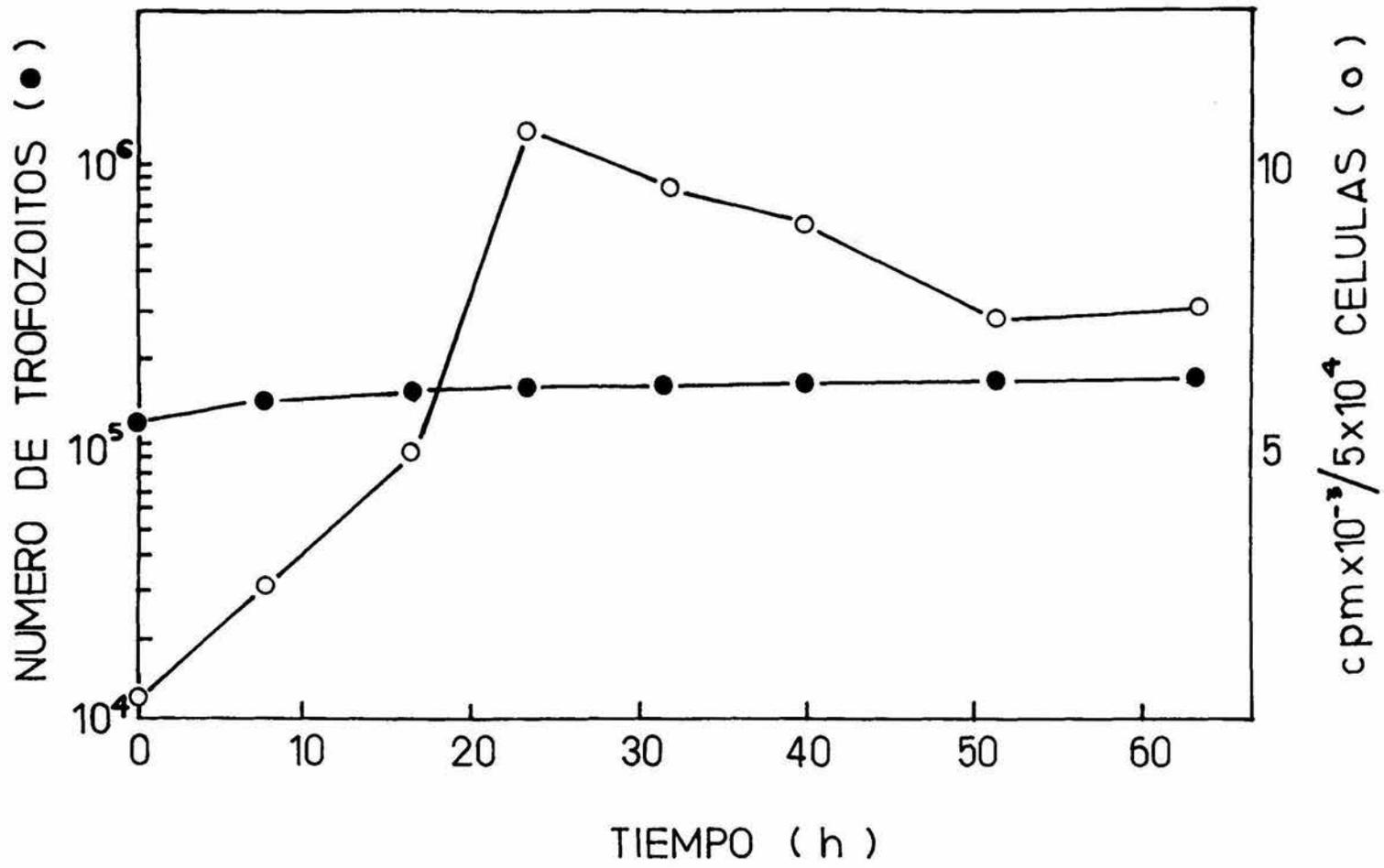
Para estudiar el efecto de la colchicina sobre la síntesis de ADN, se midió la incorporación de (³H) tim en el ADN amibiano a lo largo de 60 horas de incubación con 200 ug/ml de colchicina en el medio. La Fig. 9 muestra, que la colchicina a esta concentración inhibe el crecimiento amibiano de la clona L-6, después de 24 horas de incubación a 37° C. Sin embargo la síntesis de ADN es continua hasta por más de 24 horas en presencia de la droga, y es hasta las 30 horas en la que una disminución lineal en las cpm/amiba se observa, estabilizándose a las 50 horas de incubación.

El experimento demuestra que la síntesis de ADN no se ve afectada por la presencia de la colchicina, aún cuando el crecimiento de los trofozoítos se detenga, lo anterior probablemente produzca poliploidia en los trofozoítos, por lo que se observa la incorporación de (³H) tim después de que el número celular se estabiliza, esto probablemente provocaría que la célula tenga que compensar esa cantidad extra de ADN expulsándolo de alguna manera (micro células por ejemplo), lo que explicaría la disminución lineal en el número de cpm/amiba.

FIGURA 9

Efecto de la colchicina sobre la síntesis de
ADN en la clona L-6 de Entamoeba histolytica

Tubos de medio TYI-S-33 conteniendo 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de colchicina y 7 uCi/ml de (^3H) tim fueron sembrados con 10^5 trofozoítos de la clona L-6 de E. histolytica. La incorporación de la marca en material TCA precipitable, así como el crecimiento celular fue monitoreado cada 8 horas para estudiar el efecto de la colchicina sobre la síntesis de ADN amibiano.



8.- TINCIÓN DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE A LO LARGO DEL CICLO CELULAR DE LA CLONA L-6 DE E. histolytica

Una vez establecidas las condiciones para la sincronización celular de la clona L-6 y conociendo además que de las lectinas probadas solo la Con A presentó afinidad por la membrana celular amibiana, la superficie de la clona L-6 se marcó a lo largo del ciclo celular con Con A, con el fin de establecer diferencias en los patrones de tinción que nos diera evidencias de un recambio antigénico de superficie.

La intensidad de la fluorescencia en la superficie amibiana, se clasificó como se mencionó anteriormente. Se observó en general una homogeneidad en la tinción (Tabla IV) presentándose en la mayoría de las células (alrededor del 90 %) fluorescencia media en todo el ciclo celular. Sin embargo en las horas 3 y 4 durante la fase G_1 y en la hora 14 en la fase G_2 los porcentajes de tinción variaron, aumentando el número de células con fluorescencia alta (53.4 %, 16.1 % y 37 % respectivamente). En las horas 11, 12 y 13 los porcentajes de tinción no fueron determinados.

Los resultados no aportan evidencias lo suficientemente contundentes para decir que se observa variación antigénica de superficie a lo largo del ciclo celular de la clona L-6 de Entamoeba histolytica, no obstante si parecen indicar una buena sincronización en el cultivo, demostrable por la homogeneidad en la tinción de los trofozoítos.

9.- RADIOYODINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE SUPERFICIE A LO LARGO DEL CICLO CELULAR DE LA CLONA L-6 DE E. histolytica

Con el objeto de obtener claras evidencias de una variación antigénica de superficie, las proteínas de superficie de la clona L-6 de E. histolytica se marcaron en diferentes fases del ciclo celular con ^{125}I mediante la adaptación de Avila (1982) al protocolo de Marchalonis (1971).

TABLA IV

Tinción de la clona L-6 de E. histolytica
con Con A a lo largo de su ciclo celular.

Trofozoitos de la clona L-6 de E. histolytica se marcaron en la superficie con 100 ug/ml de Con A en cada hora de su ciclo celular en un cultivo sincrónico inducido con un tratamiento con colchicina. Fluorescencia alta (3), fluorescencia media (2), fluorescencia baja (1) y fluorescencia nula (0).

TABLA IV

FASE	HORA	INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA			
		3	2	1	0
D	0	7.6%	90.2%	1.3%	0.69%
G ₁	1	4.1%	92.5%	3.3%	0.0 %
G ₁	2	3.9%	86.5%	8.7%	0.79%
G ₁	3	53.4%	46.5%	0.0%	0.0 %
G ₁	4	16.1%	83.8%	0.0%	0.0 %
G ₁	5	1.8%	98.1%	0.0%	0.0 %
S	6	4.1%	89.6%	5.1%	1.0 %
S	7	1.5%	98.5%	0.0%	0.0 %
S	8	4.0%	95.0%	1.0%	0.0 %
S	9	2.6%	96.4%	1.0%	0.0 %
S	10	3.8%	96.1%	0.0%	0.0 %
S	11	ND	ND	ND	ND
G ₂	12	ND	ND	ND	ND
G ₂	13	ND	ND	ND	ND
G ₂	14	37.0%	55.1%	1.5%	6.2 %

ND= No determinado

Al término del radiomarcaje se observó alrededor de un 90% de integridad celular en los trofozoítos, caracterizada por su alta refringencia y su continuidad en la membrana plasmática. El 10 % restante fue descartado del paquete celular lavando los trofozoítos por centrifugación a baja velocidad.

La fig. 10 muestra el patrón electroforético de las proteínas totales de E. histolytica a diferentes tiempos después del tratamiento con colchicina, representando cada uno de ellos una fase diferente del ciclo celular.

En todos los carriles del gel donde se corrieron las muestras se observó una buena definición en las bandas de proteína teñidas con azul de Coumassie. En los extractos totales se aprecian bandas de proteína con pesos moleculares (P.M.) desde 125 hasta 14 kilodaltones (Kd), que es el rango resolutivo de los geles de poliacrilamida al 10 % usados en los experimentos.

Se pudieron observar diferencias en las bandas de proteína de 67, 76, 52 y 42 kilodaltones de peso molecular.

La autorradiografía de las proteínas de superficie (Fig. 11) muestra diferencias en las proteínas de 151, 131, 109 y 42 kilodaltones de peso molecular en las diferentes fases del ciclo celular, pudiéndose observar claramente en el análisis densitométrico de la autorradiografía (Fig. 12).

La resolución de este método con respecto a la fluorescencia es mucho mayor, pudiéndose observar variación en las proteínas de superficie en el ciclo celular de Entamoeba histolytica.

10.- ADHESION A CELULAS EPITELIALES DE LA CLONA L-6 DE Entamoeba histolytica EN EL CICLO CELULAR

Para tratar de averiguar si la variación antigénica tiene alguna implicación biológica en la virulencia de los trofozoítos, se midió la adhesión y la fagocitosis a lo largo del ciclo celular de la clona L-6 de E. histolytica para correlacionar estos eventos

FIGURA 10

Proteínas totales de la clona L-6 de E. histolytica en diferentes fases del ciclo celular.

Trofozoítos de E. histolytica de la clona L-6 fueron incubados con 200 ug/ml de colchicina durante 30 horas para sincronizar los cultivos. Proteína total de los trofozoítos en diferentes fases del ciclo celular se obtuvo y se corrió en geles de poliacrilamida SDS al 10 %. Carril 1, marcadores de peso molecular. Carri les 2 al 6 proteína total de E. histolytica a las 1, 3, 7, 11 y 16 horas después de la incubación con colchicina respectivamente.

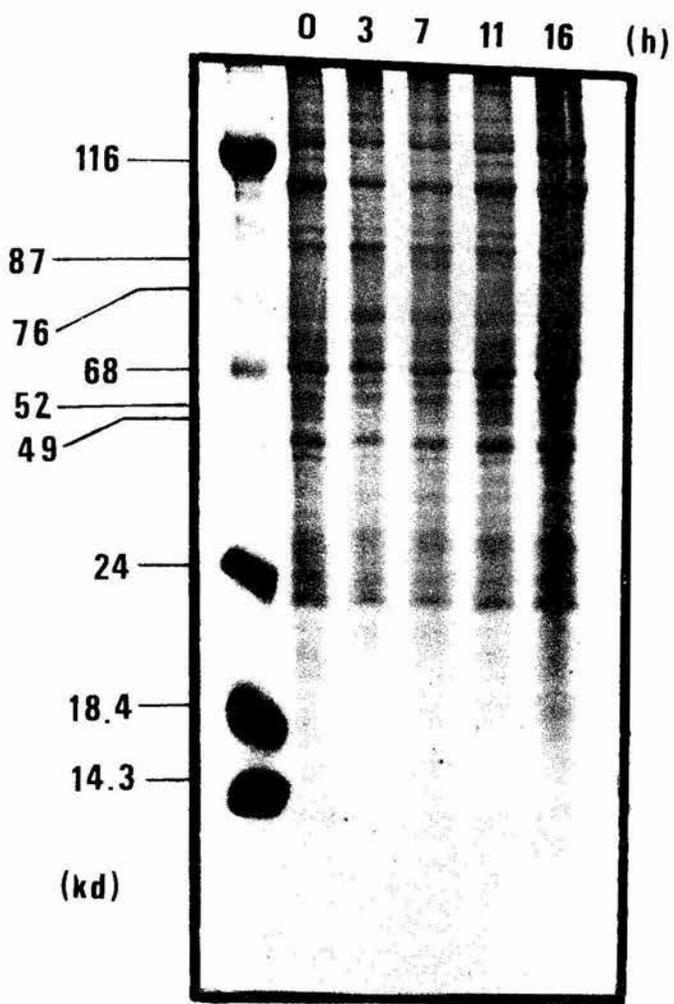


FIGURA 11

Autorradiografía de proteínas de superficie de la clona L-6 de E. histolytica marcadas con ^{125}I en diferentes fases del ciclo celular.

Trofozoítos de la clona L-6 de E. histolytica de un cultivo sincronizado con colchicina se marcaron con ^{125}I en diferentes fases de su ciclo celular. Proteína total ambiente se obtuvo en las diferentes fases y se corrió un gel de poliacrilamida SDS al 10 %. Posteriormente el gel se tiñó con azul de coumassie, se secó y se preparó para autorradiografía y así poder visualizar las proteínas de superficie. Carriles 1 al 5 proteínas de superficie de E. histolytica a las 1, 3, 7, 11 y 16 horas después del tratamiento de sincronización con colchicina respectivamente.

(h) 1 3 7 11 16

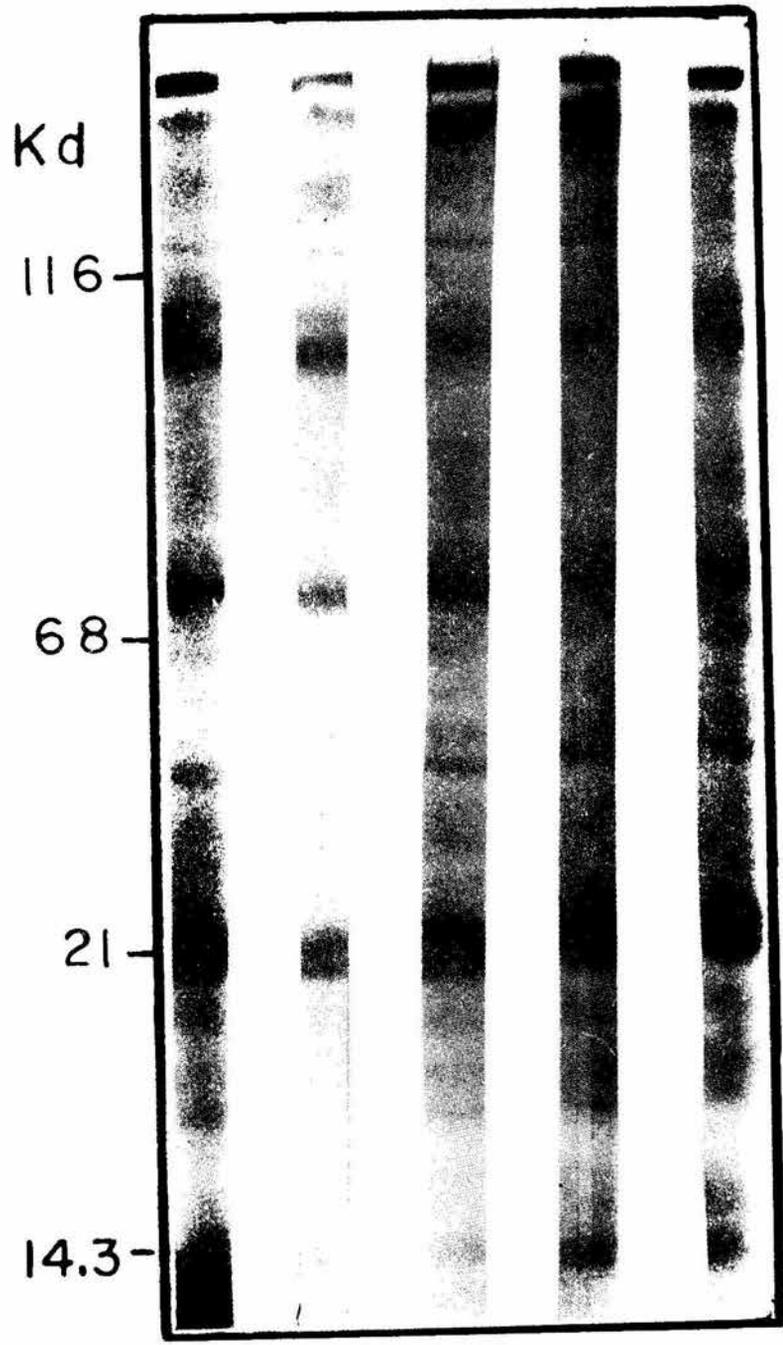
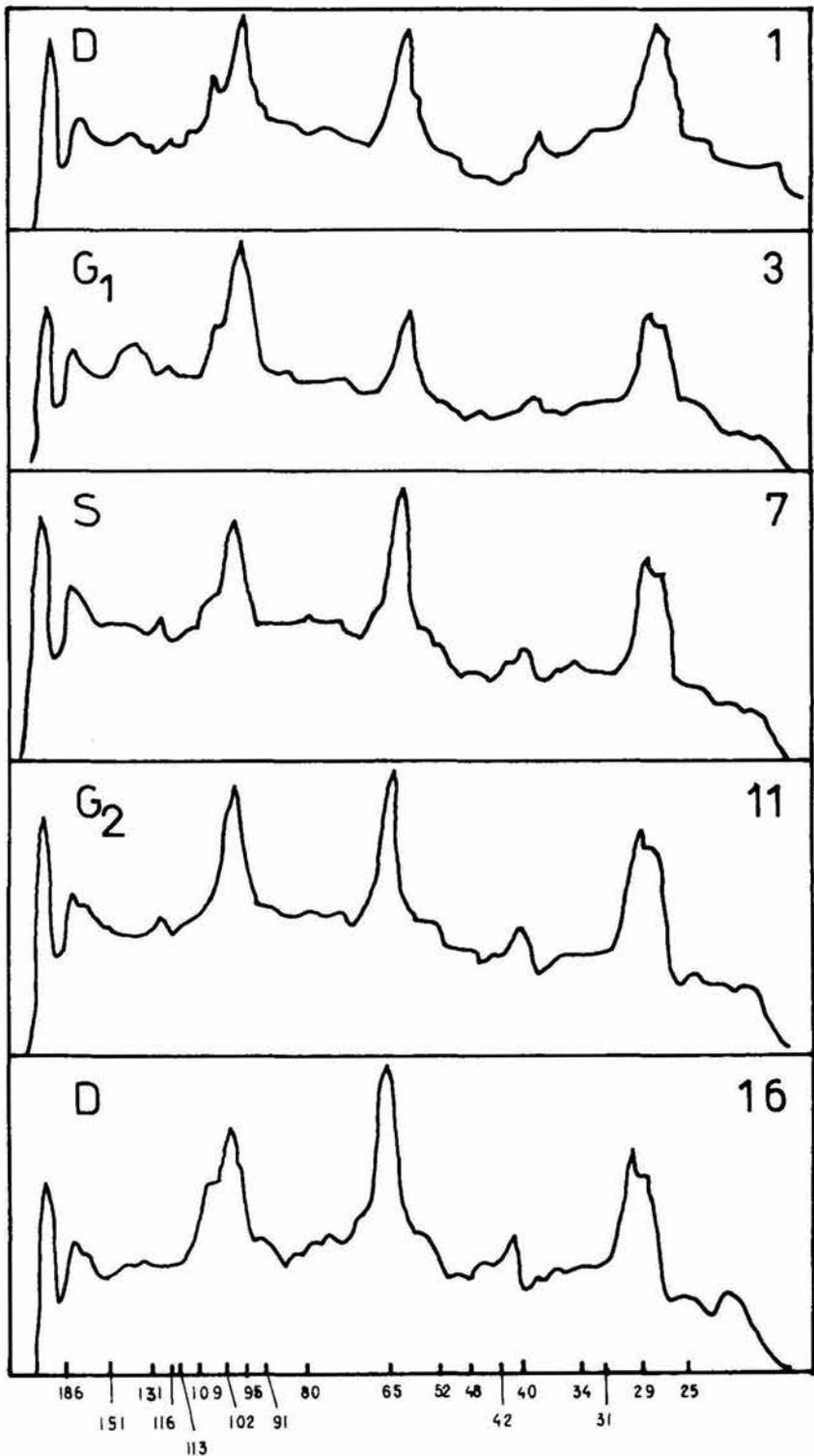


FIGURA 12

Análisis densitométrico de las proteínas de superficie de la clona L-6 de E.histolytica de diferentes fases del ciclo celular

Las autorradiografías de las proteínas de superficie de la clona L-6 de diferentes fases de su ciclo celular se analizaron densitométricamente. Paneles 1 al 5 densitometría de la autorradiografía de las proteínas de superficie de la clona L-6 a las 1, 3, 7, 11 y 16 horas después del tratamiento de sincronización con colchicina.



P. M. (kilodaltones)

con la variación antigénica, es decir con la aparición o desaparición de alguna proteína en particular a lo largo del ciclo celular.

Trofozoítos de la clona L-6 de *E. histolytica* tratados con colchicina, se incubaron con monocapas de células epiteliales MDCK para medir el grado de adhesión de las amibas en su ciclo celular. En la mayor parte del ciclo celular los trofozoítos presentaron un grado de adhesión de entre el 45 y el 60 %, siendo este rango muy parecido al control (45 %) en células no sincronizadas.

Sin embargo se observó un pico del 80 % de adhesión en la hora 4 y un valle de menos del 40 % en la hora 13. En las horas 1 y 2 no se pudo cuantificar la adhesión debido a la formación de un precipitado en los pozos.

La cinética de adhesión de la clona L-6 en el ciclo celular se muestra en la Fig. 13.

11.- ERITROFAGOCITOSIS DE LA CLONA L-6 DE *E. histolytica* EN EL CICLO CELULAR

Trofozoítos de la clona L-6 de *E. histolytica* tratados con colchicina, se ensayaron para fagocitosis de eritrocitos humanos a los 10 minutos de incubación en cada hora del ciclo celular. Los resultados muestran un pico en la fagocitosis en la hora 4 y 12 de 4 eritrocitos/amiba y un pico mayor de 6 eritrocitos/amiba en la hora 6. En las demás horas las amibas mostraron una eritrofagocitosis similar al control asincrónico (3 eritrocitos/amiba), menos en las dos primeras horas, donde la fagocitosis fue en promedio igual o menor a un eritrocito/amiba (Fig. 14).

FIGURA 13

Cinética de adhesión a monocapas de células epiteliales de la clona L-6 de E. histolytica a lo largo de su ciclo celular

10^5 trofozoítos de la clona L-6 de un cultivo sincronizado se incubaron en cada hora de su ciclo celular con monocapas de células MDCK en multicámaras limbro a 37° C durante 30 minutos. Posteriormente la preparación se fijó con glutaraldehído al 2.5 % y se retiraron los trofozoítos no adheridos para contarse y calcular el porcentaje de adhesión en cada hora de su ciclo celular. Control asincrónico 45 % de adhesión.

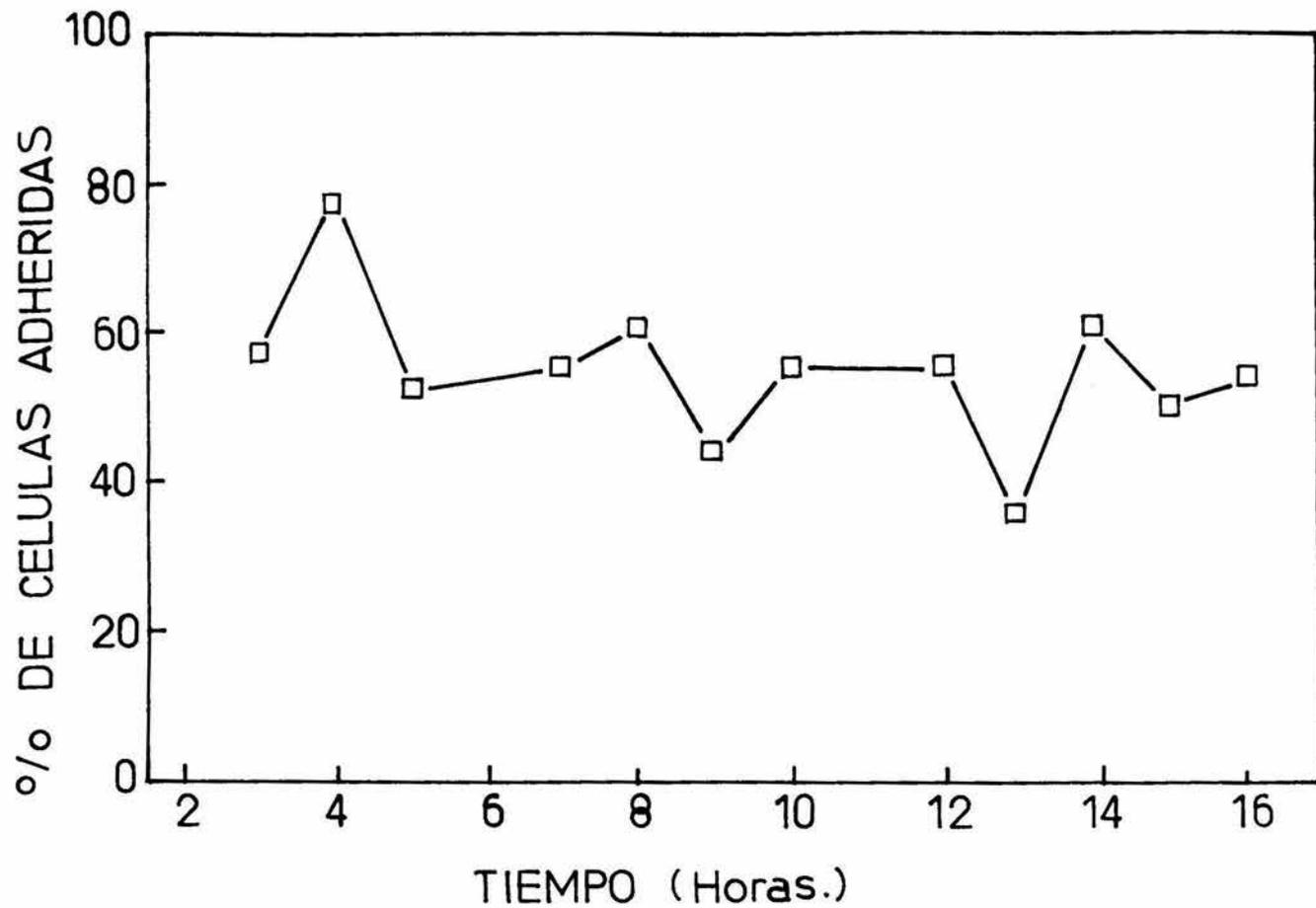
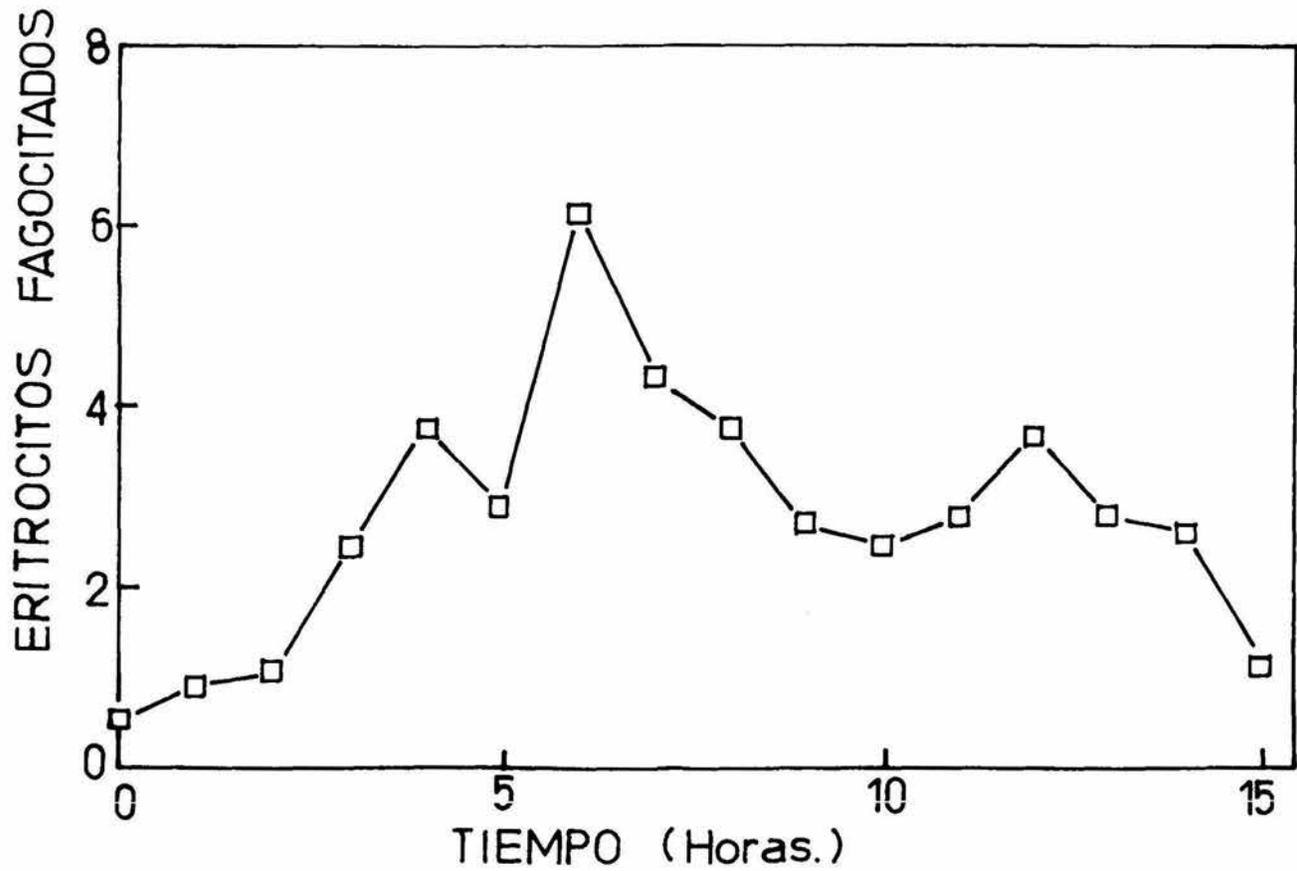


FIGURA 14

Cinética de fagocitosis de eritrocitos humanos
de la clona L-6 de E. histolytica a lo largo
de su ciclo celular

Trofozoítos de un cultivo sincronizado y eritrocitos humanos (1 a 100) se incubaron en cada hora de su ciclo celular a 37° C para medir la eritrofagocitosis durante 10 minutos. Las preparaciones se fijaron con glutaraldehído al 2.5 %, y los eritrocitos fagocitados se contrastaron con diaminobenzidina. Posteriormente se contó el número de eritrocitos fagocitados por amiba en 100 trofozoítos elegidos al azar en cada hora del ciclo celular de la clona L-6 de E. histolytica. Control asincrónico, 3 eritrocitos/amiba.



DISCUSION

Las lectinas, como ya se ha mencionado, son proteínas de origen no inmune que presentan afinidad específica por carbohidratos. Esta propiedad ha sido utilizada ampliamente en el estudio de proteínas de superficie, ya que debido a la alta especificidad que presentan es posible utilizarlas para conocer los residuos de azúcares de las glicoproteínas que están expuestas en la superficie celular. El estudio de las glicoproteínas es importante desde varios puntos de vista, por ejemplo, su participación en fenómenos de reconocimiento celular (Pippia y col., 1980). En el caso de E. histolytica, las glicoproteínas del glucocalix son las primeras moléculas que tienen contacto con el hospedero y probablemente algunas de ellas estén involucradas en la virulencia del parásito mediante la adhesión y fagocitosis de la célula blanco.

En el presente trabajo se reporta el uso de varias lectinas con afinidad por diferentes azúcares con el objeto de caracterizar los carbohidratos de las proteínas de superficie de E. histolytica. De las lectinas utilizadas solo la Con A reconoció la membrana celular amibiana. Lo anterior comprueba los resultados de Trissl y col. (1977) que E. histolytica posee en su superficie una gran cantidad de residuos de manosa y glucosa.

Los ensayos de reconocimiento y marcaje con Con A fluorescente se realizaron en dos clones de diferente virulencia, la clona L-6 no virulenta y la clona A virulenta. Los resultados mostraron diferencias en el grado de tinción en la superfi-

cie celular amibiana entre las clonas. Además se encontraron diferentes patrones de tinción, al variar la concentración de la Con A utilizada. Estos resultados sugieren que la superficie celular amibiana presenta glicoproteínas con residuos de manosa y glucosa en diferente proporción y por lo tanto las proteínas de superficie muestran afinidad diferencial por la Con A.

La Fig. 15 muestra un modelo que explica la tinción dife-rencial de los trofozoitos con Con A. El modelo propone que la superficie amibiana expone un número determinado de glicoproteí-nas con receptores para Con A, al teñir la célula con cierta concentración de lectina, ésta se une primeramente a los recep-tores con mayor afinidad por ella, probablemente aquellas gli-coproteínas con manosa y deja libres algunos receptores con afinidad más baja, al aumentar la concentración de la lectina, los receptores se saturan, hasta que todos los receptores tienen a-coplada una o más moléculas de Con A. El modelo también toma en cuenta la existencia de un porcentaje muy pequeño de amibas que no presenta receptores para Con A, para explicar por que en to-dos los experimentos un porcentaje pequeño de amibas no se ti-ñió, aún cuando se utilizaron altas concentraciones de lectina en el medio.

Las diferencias en la tinción con Con A encontradas entre ambos tipos de clonas no pueden por si solas ser explicadas en función del grado de virulencia que presentan. Y aunque existen antecedentes de que algunas propiedades de superficie correla-cionan con la virulencia amibiana, entre ellas la capacidad de aglutinación de los trofozoitos con Con A (Trissl y col.,1977). Trissl y col. proponen que no solo los receptores para la ConA

influyen en la capacidad de aglutinación de los trofozoitos, sino que otros componentes de la membrana, así como la carga de superficie determinan de manera conjunta la correlación de la virulencia amibiana. Por lo tanto, con los resultados obtenidos en esta tesis no se puede sugerir que las diferencias en la tinción con Con A entre las clonas se deban por una parte a su diferencia en la virulencia o que presenten diferentes tipos de glicoproteínas de superficie. Además, el marcaje con lectinas fluorescentes es un método de poca resolución, por lo que no es posible definir con él el tipo de glicoproteínas en la superficie celular.

Como alternativa para hacer más evidentes estas diferencias y verificar si existen cambios en los patrones de tinción a lo largo del ciclo celular se implementó una metodología para sincronizar los cultivos amibianos y estudiar las glicoproteínas de superficie en los trofozoitos de ambos tipos de clonas en sus diferentes fases del ciclo celular. Estudiando las moléculas que se expresan a través del ciclo celular fue posible encontrar correlaciones entre las glicoproteínas de superficie con la expresión de algunas actividades agresivas de la ameba como son la fagocitosis, la adhesión y el efecto citopático.

Los cultivos sincrónicos de E. histolytica no se habían podido obtener hasta recientemente, no obstante se han reportado intentos por sincronizar cultivos amibianos utilizando simultáneamente hidroxiaurea como inhibidor de la síntesis de ADN y el ayuno de nucleótidos en el medio de cultivo (Austin y Warren 1983). En esta tesis reportó un método de sincronización celu-

lar para los trofozoitos de la clona L-6 cepa HM1:IMSS de E. histolytica utilizando altas dosis de colchicina. El método alternativo que se propone presenta la ventaja sobre el de Austin y Warren que proporciona cultivos amibianos con una alta viabilidad y un índice de sincronía superior. Aunque este protocolo de sincronización no es generalizado para todas las cepas de E. histolytica, la clona L-6 puede ser considerada un buen modelo para el estudio del ciclo celular de E. histolytica, debido a que muestra una velocidad de crecimiento similar a otras cepas amibianas, incluyendo la clona A y a las cepas HM1:IMSS, HM3:IMSS y HK9 (Orozco, 1981). La clona L-6 además tiene la ventaja de que fue aislada junto con la clona A a partir de la cepa HM1:IMSS que es ampliamente utilizada en laboratorios de investigación.

El protocolo de sincronización que se propone fue difícil de establecer, ya que E. histolytica presenta en general una alta resistencia a la colchicina, e inclusive este método de sincronización no fue efectivo con otras clonas, ya que ni aún con dosis tan altas como 600 ug/ml de colchicina en el medio se produjo un efecto inhibitorio en el crecimiento. Para la clona L-6 fue necesario utilizar dosis 20 veces superior a las usadas en la sincronización de células de mamífero. Esta alta resistencia a la colchicina, había sido ya reportada con anterioridad en varias cepas de E. histolytica (Entner y col., 1962). Por otra parte existen también reportes que la colchicina carece de actividad sobre algunos mecanismos de agresión de la amiba (Raudin y col., 1980).

Como es sabido, la colchicina inhibe la polimerización de microtúbulos a nivel de metafase durante la mitosis. De ahí que el proponer en E. histolytica un posible mecanismo de sincronización celular con colchicina a este nivel que explique, por una parte, la dificultad de identificar microtúbulos a nivel de citoplasma (Martínez-Palomo, 1982), y por otra, la alta resistencia a la droga, sólo sería posible pensando en un tipo de mitosis peculiar o atípica; probablemente del tipo de endomitosis donde la colchicina tendría que atravesar la membrana plasmática y la membrana nuclear e inhibir la polimerización de microtúbulos en el núcleo. Existen reportes que apoyan la idea de una endomitosis en E. histolytica, tales como los de la existencia de microtúbulos en núcleos en división de E. histolytica (Martínez-Palomo, 1982). Y aunque existen reportes de microtúbulos citoplásmicos en cepas de E. histolytica, éstas son del tipo Laredo (Gicquard, 1979; Injeyan y col., 1979). Por otra parte, recientemente en nuestro laboratorio se han observado endomitosis en la clona L-6, utilizando autorradiografía de trofozoítos marcados con (^3H) tim y en cortes gruesos teñidos con azul de toluidina en trofozoítos tratados con colchicina (Solís, 1985).

Debido a la poca información que se tiene sobre los procesos de división de E. histolytica, este protocolo de sincronización celular podría utilizarse, además, para el estudio o identificación de las estructuras celulares que participan en el evento de división de E. histolytica. Por otra parte, aún cuando ya es posible ver endomitosis en trofozoítos de la clona L-6 tratados con colchicina, todavía existen dificultades para identi-

ficar mitosis marcadas en trofozoitos de E. histolytica bajo condiciones de cultivo normales, es decir, sin ningun tratamiento.

Para salvar el obstaculo de la dificultad de observar mitosis marcadas, la utilización del marcaje metabólico del ADN amibiano con (^3H) tim fue de gran ayuda para determinar la duración del ciclo celular de E. histolytica y de cada una de sus fases. Los experimentos de marca continua a lo largo del crecimiento sincrónico, así como los de marcaje durante la incubación con colchicina y los experimentos de pulso y caza permitieron establecer con cierta certeza que el tiempo de duración del ciclo celular es de entre 15 y 18 h, el de la fase G_1 es de 5, el de la fase S es de 6, el de la G_2 es de 3 y el de la fase D (División) es de 1 h.

Por otra parte se pudo determinar la naturaleza binaria de la división amibiana.

Una vez establecidas las condiciones de sincronización celular, fue posible estudiar los antígenos de superficie a través del ciclo celular de E. histolytica. El marcaje con Con A fluorescente a lo largo del ciclo celular de la clona L-6 de E. histolytica, demostró homogeneidad en la tinción, ya que alrededor del 90 % de la población presentó la misma intensidad y patrón de fluorescencia. Sin embargo, se observó un resultado que podría sugerir variación de las glicoproteínas de superficie a lo largo del ciclo celular de la amiba, y es el hecho de que los patrones de tinción variaron hasta en un 50 % en las fases G_1 y G_2 .

Por otra parte, el marcaje con ^{125}I de las proteínas de superficie presentó ventajas con respecto a la tinción con Con A,

ya que permitió observar diferencias claras en los patrones electroforéticos de las proteínas de superficie de E. histolytica. Los resultados demostraron diferencias en las proteínas de superficie en cada una de sus fases del ciclo celular. Estas diferencias demuestran a su vez, una variación antigénica en el ciclo celular de E. histolytica.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el recambio antigénico es utilizado por algunos parásitos para evadir la respuesta inmune del hospedero. En E. histolytica esto podría ser posible pero se requiere de un mayor estudio para afirmarlo con certeza, ya que el recambio podría tener otra significancia biológica como lo sugieren los experimentos de adhesión y fagocitosis de la clona L-6 a lo largo de su ciclo celular. Tanto la adhesión a monocapas de células epiteliales como la fagocitosis a eritrocitos humanos, variaron a lo largo del ciclo celular, encontrándose aumentados estos parámetros de medición de la virulencia in vitro, hasta en un 100 % en algunas fases del ciclo celular de la clona L-6 de E. histolytica.

Esta variación antigénica puede relacionarse con la aparición o aumento de algunas glicoproteínas o receptores de superficie necesarios en estos eventos. Sin embargo son necesarios mayores estudios en este campo.

Por último, consideramos de relevancia el hecho de reportar un método de sincronización celular para E. histolytica, ya que esto permitió establecer las primeras evidencias del recambio antigénico en el ciclo celular de este parásito.

CONCLUSIONES

- 1.- Los resultados comprueban que la mayoría de residuos de azúcares en la superficie de E. histolytica son manosa y glucosa. La Con A fluorescente tiñó en forma diferente a las clonas de E. histolytica utilizadas.
- 2.- Se estableció un protocolo de sincronización celular para la clona L-6 de E. histolytica utilizando altas dosis de colchicina. Este protocolo ofrece cultivos amibianos con una alta viabilidad y un índice de sincronía superior al 90 %.
- 3.- Se estableció que el ciclo celular de E. histolytica tiene una duración de entre 15 y 18 horas y que la fase G_1 dura 5 h, la fase S 6 h, la fase G_2 es de 3 h y la fase D (División) es de 1 hora.
- 4.- Se encontraron diferencias en las proteínas totales de E. histolytica en diferentes fases del ciclo celular, siendo notables en las proteínas de los siguientes pesos moleculares: 87, 76, 52 y 49 kilodaltones.
- 5.- Se encontraron diferencias en las proteínas de superficie de E. histolytica en diferentes fases del ciclo celular de E. histolytica en los siguientes pesos moleculares: 151, 131, 109, y 42 kilodaltones.
- 6.- Existen diferencias en el grado de adhesión de E. histolytica a monocapas de células MDCK en el ciclo celular de los trofozoítos, encontrándose una adhesión del 80 % en la fase G_1 y un 40 % en la fase G_2 , manteniéndose en un 50 % de adhesión en promedio en las demás horas del ciclo celular.

7.- Existen diferencias en el grado de fagocitosis de eritrocitos humanos en el ciclo celular de E. histolytica . Los trofozoitos mostraron en las primeras 3 horas una disminución del 66 % de la fagocitosis mostrada por el control y en la hora 6 mostraron un aumento del 100 % comparada con el control.

REFERENCIAS

- Austin, C. J. & Warren, L. G. (1983)
Induced division synchrony in Entamoeba histolytica. Effects of Hidroxyurea and serum deprivation.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 32 (3):507
- Avila E. E. (1982)
Identificación de las proteínas de membrana plasmática y del "cap" inducido por anticuerpo en Entamoeba histolytica.
Tesis de Maestría en Ciencias Depto. de Biología Celular
C. I. E. A. I. P. N.
- Blumental, G. L. & Zahler, S. AV. (1962)
Index for measurement of synchronization of cell populations
Science, 135:724
- Burdon, K. L. & Williams, R. P. (1976)
Microbiología
Publicaciones Cultural
- Burnett-Hall, D. G. & Waugh, W. A. O'. N. (1967)
Indices of synchrony in cellular cultures
Biometrics 23:693
- Calderón, J., Muñoz, M.L. & Acosta, H. M. (1980)
Surface redistribution and release of antibody-induced caps in Entamoebae
Journal of Exp. Med. 151:184
- Cantrell, W. (1958)
Mutation rate and antigenic variation in T. equiperdum
J. Infect. Dis. 103:263
- Cervantes, M. A. (1980)
Estudio de los procesos de división celular y nuclear en Entamoeba
Tesis de Maestría en Ciencias Depto. de Biología Celular
C. I. E. A. I. P. N.
- Chávez, A., Segura, M., Iturbe, I. y Aubonel, M. (1971)
Aspectos morfológicos en la biología del trofozoito de Entamoeba histolytica desde el punto de vista de la citología dinámica.
Arch. Inv. Méd. (Méx.) 2 (Supl. 1):229

- Cole, B. A., Kent, J. F. (1953)
Immobilization of Entamoeba histolytica in vitro by antiserum produced in the rabbit
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83:811
- Cook, J. R. & James, T. W. (1964)
Age distribution of cells in logarithmically growing cell populations. En Synchrony in cell division and growth pp. 485
E. Zenthen Ed. New York: Interscience Publishers Inc.
- De la Torre, M., De la Hoz, R., Landa, L. y Sepúlveda B. (1971)
Cultivos axénicos de Entamoeba histolytica
Arch. Inv. Méd. (Méx.) 2 Supl. 1:165
- Diamond, L. S. (1968)
Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudin, 1903 and E. histolytica-like amebae.
J. of Parasitology 54:1047
- Diamond, L. S., Harlow, D. R. & Cunnick, C. C. (1978)
A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba.
Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg. 72:431
- Doida, Y. & Okada, S. (1967)
Synchronization of L5178Y cells by successive treatment with excess thymidine and colcemid.
Expl. Cell Res. 48:540
- Engelberg, J. (1964)
The decay of synchronization of cell division
Expl. Cell Res. 36:647
- Entner, N., Evans, L. A. & González, C. (1962)
Genetics of Entamoeba histolytica: Differences in drug sensitivity between Laredo and other strains of Entamoeba histolytica.
J. of Protozool. 9:466
- Fletcher, K. A., Macgraith, B.G. & Jarumilinta, R. (1962)
Electron microscope studies of trophozoites of Entamoeba histolytica.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 56:496
- Freman, R. R. & Holder, A. A. (1983)
Surface antigens of malaria merozoites.
J. Exp. Med. 158:1653

Fulton, C. & Guerrini, A. M. (1969)
Mitotic synchrony in Naeqleria amebae.
Exp. Cell Res. 56:194

Garvey, J. S., Cremer, N. E. & Sussdorf, D. F. (1977)
Reagents Cap. VII en: Methods in Immunology
W. A. Benjamin, Inc. Reading, Massachussetts

Gicquad, C. R. (1979)
Étude de l' ultrastructure du noyau et de la mitose de
Entamoeba histolytica.
Biologie Cellulaire 35:305

Gillin, F. D. & Diamond, L. S. (1978)
Clonal growth of Entamoeba histolytica and other species
of Entamoeba in agar.
J. of Protozoology 25:539

Griffin, J. L. & Juniper, K. (1971)
Ultraestructur of Entamoeba histolytica from human amebic
dysentery.
Arch. Path. 21:271

Gutiérrez, G., Ludlow, A., Espinosa, G., Herrera, S.,
Munoz, O., Rattoni, N., y Sepúlveda, B. (1976)
Encuesta serológica nacional II. Investigación de anticuerpos
contra Entamoeba histolytica en la República Mexicana.
Memorias de la conferencia Internacional sobre Amibiasis
(1975) (B. Sepúlveda y L. S. Diamond, Eds.) IMSS México
D. F. pp. 597

Harrison (1977)
Medicina Interna Tomo I
Prensa Médica Mexicana

Holder, A. A. & Freman, R. R. (1982)
Biosynthesis and processing of a Plasmodium falciparum
schizont antigen recognized by immune serum and monoclonal
antibody.
J. Exp. Med. 156:1528

Howard, A. & Pelc. S.R. (1953)
Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated
cells and its relation to chromosome breakage.
Heredity, Lond. (Supl) 6:261

- Injeyan, H., Huebner, E. & Meerovitch, E. (1979)
Studies on a morphologically distinct colchicine-resistant
variant of *Entamoeba* sp.
J. of Protozoology 26:253
- James, T. W. (1959)
Synchronization of cell division in amoebae.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 78:501
- James, T. W. (1966)
Cell synchrony, A prologue to discovery. En *Cell synchrony
studies in biosynthetic regulation* (I. L. Cameron y G. M.
Padilla, Eds.) Academic Press, N.Y. pp. 1
- Kartulis, S. (1887)
Zur Aetiologie der Leberabscesse. Lebende Dysenterie-Amöben
im Eiter der dysenterischen Leberabscesse.
Central blatt für Bakteriologie und Parasitenkunde 25:745
- Kudo, R. R. (1969)
Protozoología
C. E. C. S. A. México
- Laemmli, U. K. (1970)
Cleavage of structural protein during the assembly of the head
of bacteriophage T4.
Nature 227:680
- Littlefield, J. W. (1962)
DNA Synthesis in partially synchronized L cells.
Expl. Cell Res. 26:318
- Lösch, F. A. (1875)
Massive development of amebas in the large intestine. (Traducción
inglesa de Massenlaufe entwicklung von Amöben im Dickdarm.
*Archiv für pathologische anatomie und physiologie und für
Klinische Medicin von Rudol Wirchow* 65:196
Amer. J. Trop. Med. Hyg. 24:383
- Marchalonis, J. J., Cone, R. E., & Santer, V. (1971)
Enzymic iodination. A Probe for accessible surface proteins of
normal and neoplastic lymphocytes.
Biochem. J. 124:921
- Marcus, P. I. & Robbins, E. (1963)
Viral inhibition in the metaphase arrest cell.
Proc. Natn. Acad. Aci. U. S. A. 50:1156

Martínez-Palomo, A., González-Robles, A. y Chávez de Ramírez B. (1976)
Estructura ultramicroscópica de varias cepas de Entamoeba.
Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis (1975)
(B. Sepúlveda y L. S. Diamond, Eds.) IMSS México, D.F.

Martínez-Palomo, A. (1982)
The Biology of Entamoeba histolytica
Research studies Press

Miller, J. H., Swartzwelder, J. C. & Deas, J.E. (1961)
An electron microscopic study of Entamoeba histolytica
J. Parasitol. 47:577

Mitchison, J. M. (1957)
The growth of single cells I. Schizosaccharomyces pombe.
Expl. Cell Res. 13:244

Mitchison, J. M. & Vincent, W. S. (1965)
Preparation of synchronous cell culture by sedimentation.
Nature, Lond. 205:987

Mitchison, J. M., Cummins, J. E., Gross, P. R. & Creanor, J. (1969)
The uptake of bases and their incorporation into RNA during the cell cycle of Schizosaccharomyces pombe in normal growth and after a step-down.
Expl. Cell Res. 57:411

Mitchison, J. M. (1973)
The biology of the Cell Cycle.
Cambridge University Press

Mueller, G. C. (1969)
Biochemical events in the animal cell cycle.
Fedn. Proc. Fedn. Am. Soc. Exp. Biol. 28:1780

Muller, G. C. & Kajiwarak (1966)
Early and late replicating deoxyribonucleic acid complexes in He-la nuclei.
Biochim, Biophys. Acta 114:108

Noble, E. R. & Noble, G. A. (1976)
Parasitology the Biology of Animal Parasites.
Ed. Lea & Febiger. Philadelphia

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

Olguin, T. (1984)
Estudio comparativo de la fagocitosis en dos clones de
Entamoeba histolytica de diferente virulencia.
Tesis de Licenciatura en Biología E. N. E. P. I. U.N.A.M.

Onyango, R., Raadt, P., Cunningham, M. & Hoeve, K. (1965)
Periodicity and infectivity of Trypanosomes in a man infected
with T. rhodesiense.
East. Afr. Trypanosomiasis Res. Organ. Rep. 1964:32

Orozco E. (1981)
Virulencia y Propiedades de Superficie de Entamoeba histolytica
Tesis y Doctoral en Ciencias Depto. de Biología Celular
C. I. E. A. I. P. N.

Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A. & Sánchez, T.
(1983)
Entamoeba histolytica: Phagocytosis as a virulence factor.
J. Exp. Med. 158:1511

Orozco, E., Suárez, M. E. & Sánchez, T. (1984)
Clones isolated from Entamoeba histolytica strain HM1-IMSS
show different phenotypes in adhesion, phagocytosis and virulence.
Int. J. of Parasitology. Enviado a publicación.

Osada, M. (1959)
Electron-microscopic studies on protozoa. I. Fine structure of
Entamoeba histolytica.
Keio J. of Medicine 8:99

Prescott, D.M. (1955)
Relations between cell growth and cell division. I. reduced
weight, cell volume, protein content, and nuclear volume of
Amoeba proteus from division to division
Expl. Cell Res. 9:328

Puffer, R. R. & Griffith, G. W. (1967)
Patterns of Urban Mortality. Report of the Interamerican
Investigation of Mortality. Panamerican Health Organization
Washington, D.C.

- Pippia, P., Ivaldi, G. & Cogoli A. (1980)
Identification of carbohydrates and functional groups involved
in the adhesion of neoplastic cells
Elsevier/North-Holland Biomedical Press 116:281
- Quastler, H. & Sherman, F. G. (1959)
Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the
mouse. *Expl. Cell Res.* 17:420
- Ravdin, J. I., Croft, B.Y. & Guerrant, R.I. (1980)
Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica
J. of Exp. Med. 152:377
- Rao, P.N. (1968)
Mitotic synchrony in mammalian cells treated with nitrous oxide
at high pressures.
Science N. Y. 160:774
- Reagan, J. D. & Chu, E. H. Y. (1966)
A convenient method for assay of DNA synthesis in synchronized
human cell cultures.
J. Cell Biol. 28:139
- Riadura, S. G. y López, D. C. (1968)
Análisis de la mortalidad en el Hospital General de México
S.S.A. *Rev. Méd. Hosp. Gral. Méx.* 31:259
- Rondanelli, E. G., Osculati, F. & Gerna, G. (1966)
Aspetti ultrastrutturali di Entamoeba histolytica. *Ricerchi
microelecttroniche.*
Boll. Ist. Seroter. Milan 45:279
- Rondanelli, E. G., Osculati, F., Gerna, G. & Carosi, G. (1967)
Comparazioni ultrastrutturali fra diverse specie di Entamoeba
a cisti tetranucleate (E. moshkovskii, E. histolytica- ceppo
Laredo, E. invadens).
Boll. Lab. Seroter, Milan 46:583
- Rueckert, R.R. & Mueller G. C. (1960)
Studies on unbalanced growth in tissue cultures I. Induction and
consequences of thymidine deficiency.
Cancer Res. 20:1584

- Schaudin, F. (1903)
Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden (Vorläufige Mittheilung). Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte (Beihefte an den Veröffentlichungen des Kaiserlichen Gesundheitsamtes). Berlin 19:547
- Scherbaum, O. & Zeuthen, E. (1954)
Induction of synchronous cell division in mass cultures of Tetrahymena pyriformis. Expl. Cell Res. 6:221
- Seed, J. (1972)
T. gambiense and T. equiperdum: Characterization of variant specific antigens. Expl. Parasitol. 31:98
- Sepúlveda, B. (1964)
El problema de la amibiasis hepática
Rev. Méd. IMSS 3:1
- Siddiqui, W.A. & Rudzinska, M.A. (1965)
The fine structure of axenically-grown trophozoites of E. histolytica with special reference to the nucleus and helical ribonucleoprotein bodies. Protozool. 12:448
- Smith, H. H., Fussell, C. P. & Kugelman, B.H. (1963)
Partial synchronization of nuclear division in root meristems with 5-aminouracil. Science N.Y. 142:595
- Solis, F.J. (1985) Comunicación Personal
- Suárez, M.E. (1983)
La fagocitosis como factor de virulencia en E. histolytica
Tesis de Licenciatura en Biología E. N. E. P. I. U.N.A.M.
- Terasina, T. & Tolmach, L.J. (1961)
Changes in X-Ray sensitivity of He-la cells during the division cycle. Nature, Lond. 190:1210
- Terasina, T. & Tolmach, L.J. (1963)
Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of He la cells.
Expl. Cell Res. 30:344

- Trissl, D., Martínez-Palomo, A., Argüello, C. de la Torre, M. & de la Hoz, R. (1977)
Surface properties related to concanavalin A induced agglutination. A comparative study of several Entamoeba strains
J. of Exp. Med. 145:652
- Trissl, D., Martínez-Palomo, A., de la Torre, M., de la Hoz, R. & Pérez-Suárez, G. (1978)
Surface properties of Entamoeba histolytica increased rate of human erythrocytes phagocytosis in pathogenic strains.
J. Exp. Med. 148:1137
- Van't Hof, J. (1968)
Experimental procedures for measuring cell population kinetics parameters in plant root meristems
In Methods in Cell Physiology Vol. 3 pp. 95
Ed. por D.M. Prescott. New York and London Academic Press
- Wagenar, E.B. (1966)
High mitotic synchronization induced by 5-aminouracil in root cells of Allium strain L.
Expl. Cell Res. 43:184
- Walker, P.M.B. (1954)
The mitotic index and the interphase processes.
J. Exp. Biol. 31:8
- Weinbach, E.C., Claggett, C.E., Takeuchi, T. & Diamond, L.S. (1978)
Biological oxidations and flavoprotein catalysis in Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Méd. (Méx) 9 (Supl. 1):89
- Weinbach, E.C., Harlow, D.R., Takeuchi, T., Diamond, L.S., Claggett, C.E. & Kon, H. (1976)
Aerobic metabolism of Entamoeba histolytica: fact and fallacies
Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis (1975) (B. Sepúlveda y L.S. Diamond, Eds.) IMSS México, D.F.
- Xeros, N. (1962)
Deoxyriboside control and aynchronization of mitosis
Nature, Lond. 194:682