



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

“IZTACALA”

CINETICA E INHIBICION DE LA ADHESION DE
TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica
A GLOBULOS ROJOS HUMANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

MARIA TERESA RIOS LEYVA

SAN JUAN IZTACALA, MEXICO

1985

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en el laboratorio y con la asesoría del Dr. Rubén López-Revilla.

A MIS PADRES

Con eterna gratitud, cariño, respeto
y admiración; porque me han enseñado
sencillamente la "Ciencia de la Vida"

A MIS HERMANOS:

JOSE LUIS, DAVID, ALBERTO, PILY Y LULU

Quienes con su amor, comprensión y apoyo
han sido estímulo constante para la
culminación de este trabajo.

A ABAR

Con todo mi amor por estimular
mis anhelos y mantenerse a mi
lado traspasando las barreras
del tiempo y la distancia.

AL SR. ABAR YERVES CERVERA
A LA SRA. IMELDA MALDONADO DE YERVES

Con cariño y agradecimiento por su
amabilidad y el apoyo que me han
brindado.

A MAGALY, ROGELIO, MARCOS e IMELDA

Por todo el cariño y apoyo que me
han dado.

A MARTHA, CHACHA, RAFAEL Y RICARDO

Con agradecimiento por su cariño, interés y
apoyo en la terminación de mis estudios.

A NELY, JUPITER, ARLENE Y ROGELIO

Con mucho cariño, como un estímulo
en sus vidas.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABLAS	xx
AGRADECIMIENTOS	xxi
RESUMEN	xxii

I. INTRODUCCION

A. Comunicación, reconocimiento y adhesión	
intercelular	1
Comunicación y reconocimiento intercelular . .	1
Adhesión intercelular . . . ,	2
1. Papel de la membrana plasmática en la adhesión	3
2. Especificidad y selectividad	3
3. Participación en fenómenos biológicos. .	4
a. Fertilización y uniones sexuales . .	5
b. Embriogénesis e histogénesis	5
c. Sistema inmune	6
d. Microorganismos patógenos.	6
B. Métodos para el estudio de la adhesión	
intercelular	6
Ruptura de adhesiones	7
Formación de adhesiones y ensayos de agregación.	7
Medición de adhesiones existentes en el equilibrio.	8

C. Mecanismos de la adhesión célula-célula	9
Uniones intercelulares.	9
Fertilización	9
Esponjas.	9
Hongos mucilaginosos celulares.	10
1. <u>Dictyostelium discoideum</u>	10
2. <u>Polysphondilium pallidum</u>	11
3. <u>Dictyostelium mucoroides</u>	11
D. Carbohidratos más comunes en la superficie de células de mamífero	11
E. Adhesión de microorganismos patógenos	13
Métodos para el estudio de la adhesión de los microorganismos patógenos	14
Mecanismos de adhesión de los microorganismos patógenos	16
1. Bacterias patógenas.	16
Bacterias que se adhieren al intestino.	17
a. <u>Escherichia coli</u> enterotoxigénica.	17
b. <u>Vibrio cholerae</u>	18
c. Otras bacterias intestinales	19
Bacterias que se adhieren al aparato respiratorio.	19
a. <u>Mycoplasma pneumoniae</u>	19
b. Otros micoplasmas.	19
Bacterias que se adhieren al aparato genitourinario.	20
a. <u>Escherichia coli</u> uropatogénica (ECUP, MS)	20
b. <u>Escherichia coli</u> uropatogénica (ECUP, MR)	20
c. <u>Neisseria gonorrhoeae</u>	21
Bacterias que se adhieren a la mucosa oral y a los dientes.	21
a. <u>Streptococcus mutans</u>	21
b. <u>Streptococcus sanguis</u>	22

c. <u>Streptococcus salivarius</u>	22
d. <u>Streptococcus pyogenes</u>	22
e. <u>Actinomyces</u>	23
2. Bacteriófagos y virus animales	23
Bacteriófagos	23
Virus animales.	24
3. Hongos	24
<u>Candida albicans</u>	24
<u>Cryptococcus neoformans</u>	24
4. Protozoarios parásitos	25
Plasmodia	25
a. <u>Plasmodium falciparum</u>	25
b. <u>Plasmodium vivax</u>	25
c. <u>Plasmodium knowlesi</u>	25
Leishmania.	26
a. <u>Leishmania tropica</u>	26
b. <u>Leishmania mexicana mexicana</u>	26
c. <u>Leishmania mexicana amazonensis</u>	26
<u>Trypanosoma congolense</u>	27
Giardias.	27
F. Grupos sanguíneos implicados en la adhesión de microorganismos patógenos	28
G. <u>Entamoeba histolytica</u>	29
1. Historia	31
2. Clasificación.	31
3. Morfología	32
4. Ciclo biológico.	32
5. Epidemiología.	33
6. Adhesión de los trofozoítos.	34
Estudios microscópicos.	34
Adhesión a monocapas, GR y leucocitos	36
Caracterización de la adhesión.	37
Posibles mecanismos de adhesión	39
Modelo matemático	42

II. OBJETIVOS	
A. Generales.	45
B. Particulares	46
III. MATERIALES	
A. Origen de los reactivos.	47
B. Material biológico	47
Glóbulos rojos (GR)	47
Cepas de <u>Entamoeba histolytica</u>	48
C. Preparación del medio de cultivo TPS-1	48
Medio basal TP.	48
Preparación y almacenamiento del suero de caballo	48
Medio TPS-1 completo.	49
D. Composición y preparación de soluciones.	49
Citrato-fosfato-glucosa (CPD)	49
NaCl 0.15 M	49
Solución para fijar glóbulos rojos.	50
Salino amortiguado con fosfatos (PBS)	50
Azida de sodio al 1%.	50
IV. METODOS	
A. Cultivos amibianos axénicos.	51
Cultivos, resiembras y cosechas	51
Mantenimiento de las cepas.	51
B. Obtención y manejo de los glóbulos rojos	52
Colección de sangre	52
Lavado, obtención y almacenamiento del paquete globular.	52
Fijación.	53
C. Adhesión de los trofozoítos a los glóbulos rojos.	53
Procedimiento general	53
a. Preparación de los glóbulos rojos.	53

b. Preparación de los trofozoítos	53
c. Cinética de adhesión	54
D. Cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9 de <u>Entamoeba histolytica</u> a glóbulos rojos humanos (condiciones iniciales).	54
E. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9.	55
F. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos de cinco cepas de <u>Entamoeba</u> <u>histolytica</u>	56
G. Cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9 bajo condiciones de velocidad submáxima . .	56
H. Cinética de adhesión de trofozoítos de cinco cepas a GR humanos de los grupos sanguíneos mayores ABO, bajo condiciones de velocidad submáxima	57
I. Cuantificación del porcentaje de amibas con uno o más eritrocitos adheridos en las cinéticas de adhesión.	57
J. Efecto de carbohidratos sobre la adhesión de los trofozoítos.	58
K. Efecto de la concentración de cuatro carbohidratos inhibitorios sobre la adhesión amibiana	58
V. RESULTADOS	
A. Cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9 de <u>Entamoeba histolytica</u> a glóbulos rojos humanos (condiciones iniciales).	59

B. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9.	63
1. 10^5 a 10^6 GR por ml.	63
2. 10^4 a 6×10^5 GR por ml.	66
C. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos de cinco cepas de <u>Entamoeba histolytica</u>	69
D. Cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9 bajo condiciones de velocidad submáxima . .	75
E. Cinética de adhesión de trofozoítos de cinco cepas a GR humanos de los grupos sanguíneos mayores ABO, bajo condiciones de velocidad submáxima.	78
F. Cinética de formación de complejos de adhesión específicos	86
G. Efecto de carbohidratos sobre la adhesión de los trofozoítos a glóbulos rojos de los grupos sanguíneos mayores ABO.	92
1. Efecto general de carbohidratos a concentración fija (50 mM)	92
2. Análisis estadístico de la inhibición de la adhesión por los carbohidratos usados a concentración fija (50 mM)	104
3. Frecuencia general de inhibición de la adhesión de las cinco cepas por los carbohidratos a concentración fija (50 mM).	111
4. Frecuencia de inhibición de la adhesión de cada cepa amibiana por carbohidratos agrupados según su composición	116

5. Frecuencia de inhibición de la adhesión de eritrocitos de los grupos sanguíneos mayores ABO a trofozoítos de las cinco cepas, por carbohidratos agrupados según su composición.	119
H. Efecto de la concentración de Gal, GalNAc, GlcNAc y ManNAc sobre la adhesión amibiana. . .	122
VI. DISCUSION	
A. Cuantificación de la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos a glóbulos rojos. . . .	129
Efecto de la concentración de glóbulos rojos	130
Cinética de adhesión de cinco cepas a GR humanos de los grupos sanguíneos mayores ABO, bajo condiciones de velocidad submáxima. . . .	131
B. Cinética de formación de complejos de adhesión específicos	133
C. Efecto de carbohidratos sobre la adhesión amibiana.	133
Efecto general de carbohidratos a concentración fija (50 mM)	134
Efecto de la concentración de Gal, GalNAc, GlcNAc y ManNAc.	135
VII. CONCLUSIONES	143
VIII. REFERENCIAS.	145

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Constante de velocidad de adhesión
Amiba-GR	Complejo amiba-glóbulo rojo
CFA	Antígeno factor de colonización
CPD	Solución de citrato-fosfato-glucosa
ECET	<u>Escherichia coli</u> enterotoxigénica
ECUP	<u>E. coli</u> uropatogénica
EDTA	Acido etilendinitrilotetraacético
EGTA	Acido etilenglicoltetraacético
Fru	β -D-Fructosa
Fuc	α -D-Fucosa
G	Gangliósido
Gal	D-Galactosa
GalNAc	N-Acetil-D-Galactosamina
Glc	α -D-Glucosa
GlcNAc ₂	Quitobiosa
GlcNAc ₃	Quitotriosa
GlcNAc	N-Aceti-D-Glucosamina
GR	Glóbulos rojos
GS	Grupo sanguíneo
HA	Hemaglutina, hemaglutinación
HK-9	Cepa HK-9:NIH
HM-1	Cepa HM-1:IMSS
HM-2	Cepa HM-2:IMSS
HM-3	Cepa HM-3:IMSS
HM-38	Cepa HM-38:IMSS
Lac	α -Lactosa
Mal	Maltosa
Man	D-Manosa
ManNAc	N-Acetil- β -D-Manosamina

Mel	α -D-Melibiosa
m-Man	Metil- α -D-Manósido
MR	Resistencia a manosa
MRHA	Hemaglutinación resistente a manosa
MS	Sensibilidad a manosa
NeuNAc	Acido N-Acetil-Neuramínico
NeuNGly	Acido N-Glicolil-Neuramínico
PBS	Salino amortiguado con fosfatos
PM	Peso molecular expresado en daltones
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
Sac	Sacarosa
SC	Suero de caballo
TP	Medio basal de Diamond sin suero
V_0	Velocidad inicial de adhesión
Xil	D-Xilosa

LISTA DE FIGURAS

1. Aspecto microscópico de los glóbulos rojos adheridos a los trofozoítos de <u>E. histolytica</u> . . .	60
2. Cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9 de <u>Entamoeba histolytica</u> a glóbulos rojos humanos (condiciones iniciales)	62
3. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9.	65
4. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9	68
5. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos de cinco cepas de <u>Entamoeba histolytica</u>	72
6. Cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9 bajo condiciones de velocidad submáxima. . .	77
7. Influencia del grupo sanguíneo mayor de los GR sobre la adhesión a trofozoítos de cinco cepas amibianas, bajo condiciones de velocidad submáxima	80
8. Cinética de adhesión de trofozoítos de cinco cepas bajo condiciones de velocidad submáxima . .	82
9. Cinética de formación de complejos de amibas con uno o más GR adheridos.	88

10. Relación de complejos de adhesión (A_{n+1}/A_n) en función del tiempo.	91
11. Efecto de diversos carbohidratos a concentración constante (50 mM) sobre la adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9	95
12. Efecto de diversos carbohidratos a concentración constante (50 mM) sobre la adhesión de trofozoítos de la cepa HM-1	97
13. Efecto de diversos carbohidratos a concentración constante (50 mM) sobre la adhesión de trofozoítos de la cepa HM-2	99
14. Efecto de diversos carbohidratos a concentración constante (50 mM) sobre la adhesión de trofozoítos de la cepa HM-3	101
15. Efecto de diversos carbohidratos a concentración constante (50 mM) sobre la adhesión de trofozoítos de la cepa HM-38.	103
16. Efecto de galactosa o sus análogos sobre la adhesión de trofozoítos de cinco cepas.	106
17. Efecto de manosa o sus análogos sobre la adhesión de trofozoítos de cinco cepas.	108
18. Efecto de glucosa o sus análogos sobre la adhesión de trofozoítos de cinco cepas.	110
19. Efecto de fructosa y xilosa sobre la adhesión de trofozoítos de cinco cepas	113
20. Frecuencia general de inhibición de la adhesión de las cinco cepas a GR de los grupos sanguíneos ABO por diversos carbohidratos.	115
21. Frecuencia de inhibición de la adhesión de cada cepa amibiana por carbohidratos agrupados según su composición.	118

22. Frecuencia de inhibición de la adhesión de eritrocitos de los grupos sanguíneos mayores ABO a trofozoítos de cinco cepas, por carbohidratos agrupados según su composición.	121
23. Efecto de la concentración de Gal, GalNAc, GlcNAc y ManNAc sobre la adhesión amibiana. . . .	124
24. Fórmulas estructurales de carbohidratos del grupo Gal	137
25. Fórmulas estructurales de carbohidratos del grupo Man	139
26. Fórmulas estructurales de Fru, Xil y carbohidratos del grupo Glc	141

LISTA DE TABLAS

1. Unidades de disacáridos aisladas de carbohidratos complejos de mamífero	12
2. Estructuras parciales de las cadenas de carbohidratos de los grupos sanguíneos ABH.	30
3. Ecuaciones de la velocidad inicial de adhesión de cinco cepas de <u>E. histolytica</u>	73
4. Comparación de las constantes de velocidad de adhesión (A) de trofozoítos de <u>E. histolytica</u> a GR humanos.	74
5. Ecuaciones de la adhesión amibiana en condiciones de velocidad submáxima.	84
6. Comparación de las velocidades iniciales de adhesión a GR humanos de trofozoítos de <u>E. histolytica</u>	85
7. Comparación de la potencia inhibitoria de cuatro carbohidratos sobre la adhesión a GR humanos de cinco cepas de <u>E. histolytica</u>	126
8. Diferencias entre la DI_{50} de Gal y GalNAc en las cinco cepas amibianas	127

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Rubén López-Revilla quien me ha brindado su amistad y me ha dado una verdadera formación profesional con su incomparable dirección.
- Al Dr. Rafael Cano-Mancera por ofrecerme su amistad y por su excelente asesoría y enseñanzas que han hecho valiosa esta etapa de mi formación.
- A los Q.B.P. Rodolfo Gómez Domínguez y Samuel Parra Ruiz; al Q.F.B. Roberto Quezada Calvillo y a las Biólogas Lucía Chavez Dueñas, Pilar Méndez Castrejón, Sandra Robles López y Margarita Valadez Sánchez, quienes con su afecto, apoyo y estímulo han hecho mi estancia en el laboratorio muy agradable.
- A Adrián Trejo Carmona y Crescencio Flores Reyes por su eficiencia en el trabajo y por darme su amistad.
- A Ma. Esther Cid de Ortíz y a Ma. de los Angeles Varela Munguía por su colaboración y magnífico trabajo secretarial.
- Al personal de los Departamentos de Copiado, Dibujo y Fotografía de este Centro de Investigación.
- A la Biol. Ma. de los Angeles Sanabria E., a la Biol. Martha O. Salcedo Alvarez, al Q.B.P. Napoleón Galeana Laurel y al M. en C. Sergio Vaca P., por su colaboración en la revisión de este trabajo.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización del presente trabajo.
- A mis amigos.

RESUMEN

Entamoeba histolytica es la especie del género Entamoeba que mejor se conoce. Es uno de los protozoarios que con mayor frecuencia parasitan al humano, en el que causan la amibiasis. Se encuentra ampliamente difundida en todas las áreas del mundo, aunque es más prevalente en regiones cálidas. En México la amibiasis es un grave problema de salud pública y ocupa el cuarto lugar como causa de muerte.

La adhesión de los trofozoítos de E. histolytica a células animales es el evento inicial de la citólisis por contacto y la fagocitosis y determinante de la colonización del intestino por las amibas; su estudio se ha llevado a cabo mediante diversos enfoques experimentales.

Los estudios microscópicos han revelado el contacto de los trofozoítos con las células epiteliales de la mucosa intestinal y sugerido que la invasión intestinal por las amibas puede efectuarse a través del epitelio interglandular o a través de las glándulas colónicas. Las investigaciones para caracterizar la adhesión amibiana han constituido una etapa de suma importancia en la comprensión y estudio ulterior de la adhesión, porque han permitido conocer los mecanismos celulares generales y han revelado algunos factores necesarios para la expresión y eficiencia óptimas de la adhesión. La adhesión de los trofozoítos de E. histolytica además parece depender de moléculas específicas de la superficie celular. Por otra parte, a partir de observaciones experimentales, se ha desarrollado un modelo matemático de la adhesión amibiana.

El presente trabajo, constituye una extensión de la caracterización de la adhesión de los trofozoítos de E. histolytica a glóbulos rojos (GR) humanos iniciada en el laboratorio por Cano-Mancera

(1981); ha tenido como finalidad contribuir al conocimiento de las bases fisicoquímicas y moleculares de la adhesión de E. histolytica a células animales, para tratar de definir el papel de la adhesión en la virulencia amibiana. Para ello, dividimos al trabajo en las siguientes etapas: 1) el desarrollo de condiciones de velocidad de adhesión submáxima en el sistema y la cuantificación de la velocidad inicial (V_0), 2) el estudio de la velocidad de adhesión de GR sucesivos a los complejos amiba-GR y 3) el estudio del efecto de carbohidratos sobre la adhesión.

Desarrollamos condiciones de velocidad submáxima para el sistema de ensayo de la adhesión de trofozoítos de E. histolytica a glóbulos rojos humanos en suspensión, que lo hicieron muy sensible, preciso y reproducible. Con estas condiciones, encontramos que existen dos grupos de cepas amibianas que se diferencian claramente en cuanto a su V_0 , cinética de adhesión, el número de GR que pueden adherir, y su adhesión a GR humanos de diferente grupo sanguíneo. De esta manera encontramos que la V_0 de las cepas estudiadas fué proporcional a la concentración de GR en el rango de 1 a 60×10^4 GR/ml, con 10^4 amibas/ml; la cinética de adhesión fué proporcional al tiempo de incubación (15 min) con 10^4 amibas/ml y 5 GR/amiba.

Para definir si en la adhesión amibiana participaban componentes de la superficie que mediaran el reconocimieto a través de residuos de carbohidratos, estudiamos el efecto de catorce monosacáridos o disacáridos que contenían galactosa (Gal), manosa (Man) o glucosa (Glc) y sus análogos. La frecuencia y potencia de inhibición de la adhesión fué mayor por los carbohidratos del grupo GAL, intermedia por los del grupo MAN y menor por los del grupo GLC; en general el inhibidor más potente fué GalNAc, que para la cepa HK-9 tuvo una dosis inhibitoria media de 1.3×10^6 M.

Encontramos que existen patrones específicos de cepa amibiana en la inhibición de la adhesión por carbohidratos.

De los resultados obtenidos en este trabajo, llegamos a las siguientes conclusiones: 1) la V_0 , la cinética de adhesión, el

número de GR adheridos y la adhesión a GR de diferente grupo sanguíneo son parámetros de adhesión específicos de cepa amibiana, 2) existen dos grupos de cepas amibianas de acuerdo con los parámetros antes mencionados: HK-9 y HM-3 (más rápidas y comparables entre ellas) y HM-1, HM-2 y HM-38 (más lentas y diferentes entre ellas), 3) no parece haber correlación directa de los parámetros de adhesión estudiados con la virulencia reportada de las cepas amibianas, 4) la especificidad de la adhesión amibiana parece estar determinada por componentes de la superficie celular inhibibles por carbohidratos específicos, 5) existen al menos tres residuos de carbohidratos que participan en la adhesión amibiana: Gal, Man y Glc, 6) existen patrones de inhibición de la adhesión por carbohidratos, específicos de cepa amibiana y 7) la participación de residuos de Man constituye un hallazgo nuevo para la adhesión de E. histolytica a células animales.

I. INTRODUCCION

A. Comunicación, reconocimiento y adhesión intercelular

Desde hace algunos años el entendimiento de la adhesión intercelular y de cómo la membrana celular transmite este reconocimiento a la célula, constituyen dos de los aspectos de mayor interés para la biología celular.

Comunicación y reconocimiento intercelular

La comunicación biológica se presenta en todos los niveles y se lleva a cabo mediante la transmisión y recepción de señales que generalmente son de tipo químico y permiten la comunicación tanto intraespecífica como interespecífica. La comunicación intercelular es en gran medida un fenómeno de superficie celular que depende de la existencia de elementos cognoscitivos asociados a la membrana, los receptores. La superficie membranal detecta señales ambientales que inducen, regulan o modifican la actividad celular (cf. Greaves, 1975). En algunos casos los contactos intercelulares son por sí mismos un evento regulatorio importante (Frazier y Glaser, 1979).

La mayoría de las respuestas fisiológicas requieren sensibilidad, selectividad, velocidad y reversibilidad. De esto se deduce que la unión entre ligandos y receptores no es covalente pero sí de gran afinidad, requerimiento fundamental que sólo puede ser satisfecho por la complementariedad configuracional de estas estructuras, es decir, estereoespecificidad (cf. Greaves, 1975).

La unión selectiva de ligandos está determinada por tres propiedades tanto del receptor como del ligando: geometría molecular, posición

de los grupos reactivos y flexibilidad configuracional. Las uniones químicas de estas interacciones son fuerzas electrónicas de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones coulómbicas o iónicas. Dichas uniones no garantizan un alto nivel de especificidad por sí mismas; sin embargo, como su potencia aumenta al disminuir la distancia entre los grupos que interactúan, entran en juego sólo cuando existen complementariedad suficiente para evitar las fuerzas repulsivas de los reactantes y orientación adecuada de los grupos reactivos. La suma de las fuerzas cohesivas no específicas es responsable de la unión reversible receptor-ligando y determina la fuerza de la unión; la configuración estérica es el factor decisivo en la especificidad. Otro factor importante en la funcionalidad del receptor es la flexibilidad necesaria para la formación de interacciones de alta afinidad; por lo tanto, la unión puede inducir cambios en el receptor, en el ligando o en ambos (cf. Greaves, 1985).

Adhesión intercelular

El fenómeno de la adhesión intercelular es diverso y fundamental en los seres vivos y tiene implicaciones en las uniones sexuales, el desarrollo de contactos especializados en la embriogénesis y la histogénesis, la interacción de las células con hormonas, el reconocimiento en el sistema inmune, la invasión por células neoplásicas y la interacción de células con microorganismos patógenos. Estos fenómenos dependen de receptores presentes en la membrana celular y cada célula funcionalmente diferenciada o especializada tiene su espectro particular de receptores (Greaves, 1975).

Cualquier modelo que postule que la adhesión intercelular depende de receptores específicos, implica que al menos una de las moléculas que interactúan es una proteína o glucoproteína (Frazier y Glaser, 1979). Estas son las únicas moléculas que tienen la versatilidad configuracional requerida para las interacciones específicas. Los receptores pueden ser moléculas bifuncionales con uno o más sitios de unión, y con sitios adicionales que pueden comunicar el evento de unión a la maquinaria celular (Greaves, 1975).

1. Papel de la membrana plasmática en la adhesión

El entendimiento de las interacciones ligando-receptor, depende del conocimiento de la estructura básica de la membrana plasmática. El modelo del mosaico fluido de la membrana plasmática incluye dos conceptos principales: 1) las proteínas y glucoproteínas están insertadas asimétricamente en la bicapa lipídica y 2) los lípidos forman la matriz de la membrana y un medio viscoso que permite la movilidad lateral o difusión de las moléculas proteínicas, que así pueden actuar en sitios relativamente distantes. La fluidez de la membrana plasmática parece esencial para las interacciones entre las estructuras proteínicas, como un paso obligado para su función. Las proteínas pueden tener una distribución desordenada o formar agregados en la membrana y pueden además sufrir movilización lateral (cf. Greaves, 1975).

La redistribución de las moléculas superficiales puede llevarse a cabo por difusión lateral pasiva altamente dependiente de la temperatura, pero independiente de ATP y de la síntesis de proteínas. La unión de ligandos multivalentes a sitios de unión o estructuras receptoras en la superficie celular puede inducir redistribución de estas moléculas en múltiples agregados de tamaño progresivamente mayor, que bajo condiciones apropiadas pueden llegar a formar un agregado único o "cap" en un polo de la célula. El "capping" es un proceso activo dependiente del metabolismo celular y probablemente regulado por estructuras contráctiles citoplásmicas (cf. Greaves, 1975).

2. Especificidad y selectividad

Dentro de los fenómenos biológicos, se consideran "específicos" a aquellos en los cuales existe una exclusividad absoluta, como los siguientes: la absorción por ciertos compuestos de ciertas longitudes de onda de luz, la reacción entre enzimas y sus sustratos, la unión entre un óvulo y un espermatozoide, la acción de una hormona en su órgano blanco, el efecto de los genes sobre los caracteres

del desarrollo, la asociación entre un parásito y su huésped, la respuesta adecuada del sistema inmune a un estímulo antigénico, y los factores de reconocimiento y evaluación que caracterizan nuestras funciones mentales (cf. Greaves, 1975).

La "adhesión específica" se refiere a aquella situación en donde una célula dada puede adherirse a células de su propio tipo, pero no a células de tipo diferente o a otras superficies. Por definición, una situación que no muestre este grado de exclusividad, muestra "no especificidad o selectividad". La "adhesión selectiva" describe entonces situaciones en donde una célula dada se puede adherir a células de su propio tipo, de tipo diferente y a otras superficies, pero en donde además, las células de tipo similar tienden a coagregarse. Así, la selectividad permite una situación en donde existe elección y un arreglo puede ser preferido a otro. La especificidad sólo permite configuraciones que involucran un solo tipo celular. La no especificidad de la adhesión celular ha sido incluida en el concepto del "potencial adhesivo" de un tipo celular, que se define como el rango completo de otros tipos de células y sustratos a los cuales las células de un tipo se pueden adherir (Garrod y Nicol, 1981).

En el caso de la adhesión intercelular, principalmente la de las células embrionarias y de los tejidos, la adhesión no específica parece ser la norma.

El comportamiento adhesivo de las células ha sido estudiado en esponjas, embriones de erizo de mar, hongos mucilaginosos celulares y especialmente en células embrionarias de vertebrados (cf. Frazier y Glaser, 1979; cf. Garrod y Nicol, 1981).

3. Participación en fenómenos biológicos

Como ya se ha mencionado, la adhesión intercelular es un fenómeno diverso y fundamental en los seres vivos. A continuación se describen cuatro ejemplos para dar una idea de su importancia.

a. Fertilización y uniones sexuales. La fertilización es uno de los ejemplos más fácilmente demostrables de interacción específica (Frazier y Glaser, 1979; Monroy y Rosati, 1979). La fusión celular en la levadura Hansenula wingeie es uno de los sistemas de reconocimiento sexual mejor estudiados; la observación crucial en este sistema fué la demostración de una interacción complementaria que dió lugar a la formación de un complejo en solución. Los gametos competentes de Paramecium y Chlamydomonas forman pares estables a través de cilios o flagelos, respectivamente. En bacterias los pili sexuales juegan un papel importante en el apareamiento y es posible que a través de ellos se transporte el DNA de las bacterias masculinas a las femeninas (cf. Graves, 1975).

b. Embriogénesis e histogénesis. Es probable que la embriogénesis involucre interacciones de la superficie celular, tanto selectivas como invariantes. Estas múltiples reacciones requieren mecanismos moleculares con grados variables de especificidad.

El reconocimiento en la embriogénesis debe estar influido por los siguientes factores: 1) movimientos morfogenéticos y migraciones celulares, 2) diferenciación de las células en términos de una restricción genética secuencial de sus potencialidades, 3) fenómenos de inducción, 4) histogénesis u organogénesis y 5) acoplamiento y regulación funcional. Algunas interacciones celulares en la embriogénesis probablemente ocurren a través de estructuras de superficie que son verdaderos receptores en el sentido de que interaccionan con, o se unen a un ligando y pueden iniciar una respuesta celular (Greaves, 1975).

Se ha demostrado que células disociadas de tejido embrionario se reasocian espontáneamente para formar estructuras similares al tejido de origen; si bien la reconstrucción del tejido no es idéntica a la histogénesis in vivo, los mecanismos responsables son similares y el entendimiento del proceso de agregación parece fundamental para entender el desarrollo de los tejidos (Umbreit y Roseman, 1975).

En animales multicelulares, la adhesión celular es un proceso fundamental para establecer la arquitectura de tejidos y órganos.

Se cree que la anormalidad en las propiedades adhesivas de las células es causa de alteraciones importantes, como metástasis cancerosas y malformaciones ontogenéticas (Aoyama et al., 1980).

c. Sistema inmune. Este sistema implica la máxima sofisticación en cuanto a especificidad, diversidad y memoria. Muchas estructuras diferentes intervienen en el reconocimiento, pero el sitio de unión de los antígenos es la estructura clave para la especificidad de las respuestas inmunes. Las moléculas que reconocen a los antígenos son las inmunoglobulinas, secretadas a la sangre y al líquido intercelular por linfocitos B.

Los linfocitos B tienen sitios de unión para complejos antígeno-anticuerpo aislados y unidos a complemento. Las células T tienen estructuras de superficie para la interacción con otras células T, células B y macrófagos (cf. Greaves, 1975).

d. Microorganismos patógenos. La infección de las bacterias por bacteriófagos y de células animales por virus y otros microorganismos patógenos y parásitos, son otros ejemplos de interacción. En la mayoría de los casos el reconocimiento parece involucrar a moléculas específicas de la superficie celular como se describirá adelante.

B. Métodos para el estudio de la adhesión intercelular

Para el estudio de la adhesión intercelular se han utilizado ensayos muy variados; en general con algunos se obtienen mediciones cuantitativas de la adhesividad celular y con otros se tiene información cuantitativa acerca de diferencias cualitativas. El término "medición" se usa cuando se determina cuantitativamente la fuerza de la adhesión celular, es decir, la contribución total de los mecanismos adhesivos involucrados (Garrod y Nicol, 1981).

Los ensayos de adhesión se pueden agrupar de acuerdo al método en tres categorías: 1) ruptura de adhesiones, 2) formación de adhesiones y ensayos de agregación y 3) medición de adhesiones existentes en el equilibrio.

Ruptura de adhesiones

Este método permite medir la fuerza necesaria para obtener la separación de las células, ya sea de algún sustrato o de otras células, por medio de una fuerza generada en el medio de incubación (Garrod y Nicol, 1981).

Formación de adhesiones y ensayos de agregación

El método más común para estudiar la adhesión celular consiste en seguir la agregación de las células en suspensión, la cuál es fácil de cuantificar y proporciona una comparación útil de las propiedades celulares adhesivas. Los ensayos son los siguientes (cf. Frazier y Glaser, 1979):

- 1) Desaparición de células individuales en agregados. Usado para medir la especificidad de agentes bloqueadores o promotores de la adhesión, como lectinas, anticuerpos y membranas.
- 2) Unión de células individuales o pequeños agregados a células inmovilizadas o agregados grandes. Util para parámetros mecánicos.
- 3) Formación de agregados mixtos o segregados a partir de células marcadas diferencialmente. Requiere la separación manual de agregados individuales.
- 4) Unión de membranas plasmáticas a las células. Se cuantifica fácilmente con membranas marcadas; sin embargo, pueden no retenerse los componentes adhesivos de la superficie original o éstos pueden estar alterados.
- 5) Medición del tamaño de agregados después de una incubación prolongada in vitro. Util para estudiar procesos complejos de diferenciación y sobrevivencia, aunque puede no reflejar la adhesividad celular, sino los efectos de hormonas y nutrientes sobre las células.

La forma más popular de llevar a cabo los ensayos de agregación es la mediada por rotación o giro. En cuanto a la forma de medir

la agregación, la más simple es por inspección visual de la suspensión, sin conteo, aunque el método más directo es el conteo visual de la disminución de células individuales en un hematómetro. La cuantificación visual directa tiene el mérito de que da información acerca de la integridad de las células; sin embargo, es tediosa por lo que se han adoptado técnicas de conteo más rápido.

La adhesividad total no puede ser medida por experimentos de agregación, porque: 1) se forman diferentes tipos de uniones a diferentes velocidades después de que las células han establecido contacto, y 2) una vez que la formación de un tipo particular de unión ha empezado, continúa progresivamente. La mayoría de los estudios de agregación sólo relacionan los eventos iniciales de la adhesión celular; ésta debe involucrar la interacción de uno o más tipos de receptores y de uno o más tipos de mecanismos completamente independientes. La formación de la unión debe proseguir entonces por un secuestro de receptores similares, agrupamiento de los mismos y movimiento lateral de estos dentro de la bicapa fluida. Por lo tanto, los experimentos de agregación deben servir como un medio para estudiar la función de los receptores involucrados en la adhesión inicial. Estos pueden ser o no los mismos receptores que estén involucrados en la adhesión tardía (cf. Frazier y Glaser, 1979; cf. Garrod y Nicol, 1981).

Medición de adhesiones existentes en el equilibrio

Este tipo de medición es una variación de la técnica para la medición de la tensión superficial. Se ha utilizado con tejidos de embriones de pollo, se forman agregados o fragmentos de tejido de un tamaño definido al equilibrio, bajo una fuerza centrífuga; el incremento en el área superficial de los agregados es medido y usado para computar la energía libre interfacial específica de los agregados, lo cual da una medida de la adhesividad celular.

Este método no es útil para investigar las bases moleculares de la adhesión celular, pero es de gran utilidad para estudiar el comportamiento celular en la morfogénesis (Garrod y Nicol, 1981).

C. Mecanismos de adhesión célula-célula

A continuación se describen algunos de los factores moleculares que han sido identificados e involucrados en la adhesión intercelular (cf. Frazier y Glaser, 1979; cf. Garrod y Nicol, 1981).

Uniones intercelulares

La estructura de las uniones celulares de diferentes tipos de vertebrados es muy constante. Se acepta que las interacciones son completamente específicas para el tipo celular, lo que puede explicar la no especificidad de la adhesión celular.

El modelo más reciente para la estructura de las uniones comunicantes sugiere que hay proteínas con pesos moleculares (PM) de 25,000 a 30,000, arregladas en hexámeros que constituyen las subunidades estructurales de la unión, conocidas como conexones. Los desmosomas contienen 75% de proteína separable en más de 20 polipéptidos PAS positivos con PM de 130,000 a 140,000. La naturaleza de estos desmosomas varía entre diferentes tipos de células epiteliales.

Fertilización

En Saccharomyces cerevisiae, las interacciones celulares pueden ser facilitadas por la liberación de factores semejantes a hormonas. Las levaduras del tipo α liberan un polipéptido de PM de 1,000 a 2,000 que inhibe el ciclo celular en el tipo complementario, β ; esta inhibición del ciclo facilita el apareamiento. En la superficie de células no fertilizadas del erizo de mar existen glucoproteínas que reconocen una lectina del espermatozoide activado llamada bindina.

Eponjas

De células de Microciona prolifera, M. patherna y Haliclona acculata se ha aislado un factor de agregación (AF), que promueve la agregación de células disociadas de la misma especie. Contiene cantidades aproximadamente iguales de proteína y carbohidrato y parece tener un PM de 20,000,000; su actividad es destruída por

glucoronidasa y es inhibida por ácido glucorónico. Los receptores son proteínas con PM entre 45,000 y 60,000 (Frazier y Glaser, 1979).

El sistema de cohesión de Geodia cydonium es más complicado: a) existe un AF con PM de 23,000; b) un receptor que está predominantemente formado por carbohidratos, con PM de 15,000 y cuya actividad es destruida por β -glucuronidasa asociada a la membrana y restaurada por una glucoroniltransferasa; c) existe una glucoproteína con PM de 180,000 que inhibe al AF llamada receptor de anti-agregación; d) finalmente, existe una lectina específica por galactosa, que inhibe al receptor de anti-agregación (Frazier y Glaser, 1979).

Hongos mucilaginosos celulares

El estudio de los mecanismos adhesivos de estos hongos está más avanzado que en ningún otro grupo de organismos (Frazier y Glaser, 1979).

1. Dictyostelium discoideum contiene mecanismos de agregación múltiples: a) sitios de contacto A, que aparecen en el momento de la agregación quimiotáctica y son responsables de la cohesión término-terminal de las células; son glucoproteínas que unen concanavalina A, tienen un PM de 80,000 a 90,000 y hay 3×10^5 por célula. Absorben la actividad inhibitoria de la adhesión por fragmentos Fab; b) sitios de contacto B, que están presentes en la célula vegetativa, persisten durante la agregación y están involucrados en la cohesión látero-lateral; c) GP₁₅₀, una glucoproteína de 150,000 de PM que une concanavalina A. Los fragmentos Fab anti-GP₁₅₀ inhiben la adhesión celular; d) una glucoproteína con PM de 95,000 aparece después del estadio de agregación; absorbe la actividad inhibitoria de la adhesión por fragmentos Fab producidos contra la membrana plasmática; e) discoidina I es una lectina con cuatro subunidades con PM de 26,000; f) discoidina II, es también una lectina con PM de 24,000. Tanto la discoidina I como la discoidina II aglutina eritrocitos de carnero y este efecto es inhibido por carbohidratos de la configuración D-galactosa; g) una glucoproteína que une concana-

valina A y cuyo PM no se conoce aún; inhibe completamente la adhesión de células de la fase vegetativa; h) un factor de PM muy bajo (1,000) que tiene la misma función que la glucoproteína anterior; e i) un factor inhibidor de la agregación (AIF) que tiene un PM de 1,000 a 1,300 y que inhibe la formación de contactos durante la agregación quimiotáctica.

2. Polysphondylium pallidum posee varias lectinas llamadas palidinas. Se han estudiado tres y la principal tiene un PM nativo promedio de 250,000 con subunidades de 25,000; es inhibida por galactosa.

3. Dictyostelium mucoroides produce una lectina principal, la mucoroidina I con PM de 24,000 a 26,000.

La adhesión intercelular es más complicada de lo que generalmente se supone, ya que cualquier tipo celular dado posee diferentes mecanismos de adhesión. Las glucoproteínas parecen ser los receptores más comunes, sin embargo, la adhesión celular no puede ser explicada en términos de un solo mecanismo, como un factor de agregación, una molécula de adhesión celular, una cognina, una interacción ligando-receptor o una glucosiltransferasa (Garrod y Nicol, 1981).

D. Carbohidratos más comunes en la superficie de células de mamífero

Como se ha descrito anteriormente, si la adhesión intercelular depende de receptores específicos, al menos una de las moléculas que interaccionan en este reconocimiento es una proteína o glucoproteína (Frazier y Glaser, 1979) y como se describirá posteriormente, en general los receptores en la superficie de la célula huésped para los microorganismos patógenos, contienen carbohidratos. En la Tabla 1 se muestran algunas de las unidades de disacáridos más comunes que se han aislado de la superficie de células de mamíferos. La mayoría de los carbohidratos de estos disacáridos son de la serie D-, e intervienen en muchos de los mecanismos conocidos de adhesión intercelular y de adhesión de microorganismos patógenos. Como se

TABLA 1. Unidades de disacárido aisladas de carbohidratos complejos de mamíferos (Fasman, 1975).

Disacárido	Origen
Gal(α ,1 \rightarrow 3)Gal	Trihexosilceramida de rata; Pentaglicosilceramida del eritrocito de conejo; GS B.
Gal(α ,1 \rightarrow 4)Gal	Digalactosilceramida humana; Trihexosilceramida humana.
Gal(β ,1 \rightarrow 3)GalNAc	G _{M1} ; G _{D1a} .
Gal(β ,1 \rightarrow 3)GlcNAc	Le ^a .
Gal(β ,1 \rightarrow 4)GlcNAc	Varios GS.
GalNAc(α ,1 \rightarrow 3)Gal	GS A; Le ^a ; Pentaglicosilceramida del conejo.
GalNAc(β ,1 \rightarrow 4)Gal	Varios gangliósidos.
GlcNAc(β ,1 \rightarrow 2)Man	Glucoproteína MN del eritrocito.
GlcNAc(β ,1 \rightarrow 3)Gal	Varios GS; G _{M1} hepático.
GlcNAc(β ,1 \rightarrow 4)Gal	G del bazo de bovino.
GlcNAc(β ,1 \rightarrow 6)Gal	GS H; Le ^a .
GlcNAc(β ,1 \rightarrow 6)GalNAc	Le ^a .
Fuc(α ,1 \rightarrow 2)Gal	GS A, B y H; Le ^b tipos 1 y 2.
Fuc(α ,1 \rightarrow 3)GlcNAc	Le ^a , Le ^b tipo 2.
Fuc(α ,1 \rightarrow 4)GlcNAc	Le ^a ; Le ^b tipo 1.
Man(α ,1 \rightarrow 3)Man	G _{M1} hepático.
NeuNAc/NeuNGly(α ,2 \rightarrow 3)Gal	G _{M1} ; G _{M2} ; G _{M3} .
NeuNAc/NeuNGly(α ,2 \rightarrow 8)NeuNAc	G _{D1b} ; G _{D2} ; G _{D3} ; G _{T1a} ; G _{T1b} .

Abreviaturas: Fuc (L-fucosa); G (gangliósido); Gal (galactosa); GalNAc (N-acetil-galactosamina); GlcNAc (N-acetil-glucosamina); GS (grupo sanguíneo); Le (antígeno Lewis); Man (manosa); NeuNAc (ácido N-acetil-neuramínico); NeuNGly (ácido N-glicolil-neuramínico).

puede ver el origen de estos carbohidratos es una glucoproteína o un glucolípido.

E. Adhesión de microorganismos patógenos

La virulencia de los microorganismos se define como su capacidad relativa para evadir las defensas del huésped y producir enfermedad; es el resultado de la interacción de muchas variables, tanto del germen patógeno como del huésped. Entre las variables comunes a muchos microorganismos en la producción de enfermedad se encuentran: la adhesión, la proliferación local, la colonización, el daño del tejido, la invasión y la diseminación; entre las variables del huésped para evitar la infección se encuentran las defensas genéticas y las inmune específicas y no específicas (Sparling, 1983).

Mediante la adhesión los gérmenes pueden establecerse, mantenerse y reproducirse en los tejidos y tienen la posibilidad de invadirlos y de resistir las defensas normales del huésped (Costerton et al., 1978; Lindley, 1980). Muchos estudios de interacción entre bacterias y células animales muestran que la adhesión resulta de la asociación entre moléculas específicas de la superficie de las bacterias -las adhesinas- y los receptores correspondientes en las células del huésped. A las bacterias que tienen este mecanismo de adhesión se les denomina "patógenos adherentes" (Cheney et al., 1979), grupo que incluye a los que se adhieren a la mucosa intestinal, al aparato genitourinario, al aparato respiratorio, a las válvulas cardíacas, a la mucosa oral y a los dientes. Una propiedad de estas especies bacterianas es la de aglutinar glóbulos rojos (GR) de varias especies mediante sus adhesinas (Banai et al., 1978; Evans et al., 1977; Feldner et al., 1979).

Se han identificado muchas adhesinas bacterianas; los receptores de estas adhesinas se encuentran en la superficie de los órganos afectados y en general contienen residuos de carbohidratos específicos (Gibbons et al., 1975; Jones y Freter, 1976; Ofek et al., 1977).

Su distribución determina muchos de los tropismos de especie y de tejido para las bacterias (Sparling, 1983). La inmunización con adhesinas causa disminución o pérdida de la virulencia (Acres *et al.*, 1979; Isaacson *et al.*, 1980; Morgan *et al.*, 1978; Morris *et al.*, 1980; Nagy, 1980; Nagy *et al.*, 1978; Yancey *et al.*, 1979). Las adhesinas y los receptores están determinados genéticamente (de Graaf *et al.*, 1980; Ørskov y Ørskov, 1966; Williams *et al.*, 1978). La ausencia de receptores determina resistencia natural a la infección bacteriana (Sellwood *et al.*, 1975).

Los estudios de interacción entre bacteriófagos, virus animales, hongos y protozoarios con células del huésped, demuestran también que la adhesión depende de moléculas específicas de las superficies de estos gérmenes patógenos y de sus células huésped.

Métodos para el estudio de la adhesión de los microorganismos patógenos

Se ha usado una gran variedad de modelos experimentales para el estudio *in vitro* de la adhesión de los patógenos adherentes; estos modelos son más útiles para determinar las bases moleculares y algunos de los mecanismos adhesivos que un patógeno dado puede exhibir. Su empleo se basa en que la adhesión es un fenómeno real que depende de la presencia de adhesinas y receptores específicos de la superficie celular. Se ha encontrado que las condiciones de cultivo de los microorganismos modifica considerablemente la producción de adhesinas; algunos gérmenes pueden sintetizar más de una adhesina que puede tener una función específica en algún momento de su ciclo vital y no necesariamente en el huésped. Por otra parte, las condiciones de los ensayos *in vitro* y las propiedades fisicoquímicas de la superficie de los gérmenes pueden ser manipuladas de tal manera que puede hacerse que cualquier microorganismo se adhiera a cualquier superficie. Lo más importante es entonces, definir si la adhesión observada *in vitro* juega algún papel en la virulencia del patógeno en estudio (Freter y Jones, 1983).

La adhesión de los gérmenes patógenos y la identificación de los mecanismos adhesivos han sido realizados con el empleo de los siguientes modelos experimentales: 1) suspensiones de microorganismos y una gran variedad de tipos celulares, 2) monocapas de muchos tipos celulares, 3) monocapas de células epiteliales hechas a partir de explantes, 4) explantes de tejido, 5) cultivos de órganos, 6) bordes de cepillo de intestino, 7) membranas celulares, 8) mutantes no adhesivas bien caracterizadas, 9) células infectadas con virus, 10) vidrio, 11) plástico, 12) superficies inertes, 13) técnicas de agregación, 14) hemaglutinación (HA), 15) microscopía óptica y electrónica, y 16) con el uso de inhibidores específicos de la adhesión, como carbohidratos, lectinas y anticuerpos específicos.

En general los criterios necesarios para seleccionar un modelo de adhesión son: 1) que la adhesión exista y pueda ser cuantificada y 2) que el sistema pueda ser manipulado para identificar y aislar los mecanismos fisicoquímicos y moleculares involucrados.

Los GR son muy usados porque sus receptores en general son similares a los receptores naturales (Jones e Isaacson, 1983). Originalmente, la prueba de hemaglutinación se relacionó con la presencia o ausencia de una adhesina o con la adhesión natural que existía en el tejido in vivo; en esos casos constituyó una medida conveniente y rápida de la adhesividad. Sin embargo, cuando esta prueba se usa para el aislamiento de factores de adhesión, puede ser potencialmente errónea ya que: 1) algunas bacterias se agregan espontáneamente y puede haber pruebas falsas positivas; 2) algunos individuos producen GR no reactivos, lo que puede resultar en pruebas falsas negativas; y 3) algunas cepas que producen la misma adhesina y que dan una HA con una especie de GR, pueden producir HA positiva o negativa con otras especies. Por lo tanto, para un estudio inicial deben probarse una gran variedad de GR y de condiciones de los ensayos (Freter y Jones, 1983).

La cuantificación de la adhesión debe reflejar la proporción de células del germen patógeno que se puede adherir a las células blanco; ésto constituye una medida de su adhesividad. La cuantificación

de la adhesión en términos del número de células-sustrato con un número dado de gérmenes adheridos, es más bien una medida de la receptividad del sustrato que de la adhesividad del microorganismo; las diferencias en receptividad pueden reflejar diferencias en la producción de receptores, que pueden estar relacionadas con el genotipo de las células de los individuos de las que fueron obtenidas y por lo tanto, pueden encontrarse resistencias naturales (Freter y Jones, 1983).

La asociación de un microorganismo con su órgano blanco es el resultado de un equilibrio final entre reacciones sinérgicas y antagónicas. El entendimiento de estas reacciones requiere del empleo de sistemas más complejos, como los animales de experimentación en los que pueda analizarse la secuencia completa de eventos necesarios para que un microorganismo colonice su órgano blanco. Dichos eventos son: 1) el contacto activo o pasivo con la superficie mucosa, 2) la penetración activa o pasiva del moco, 3) la adhesión a la superficie de la célula epitelial, y 4) la multiplicación y diseminación del germen patógeno. Por lo tanto, el entendimiento satisfactorio del papel de cualquier mecanismo adhesivo, requiere no sólo la elucidación de sus bases moleculares y bioquímicas, sino también requiere el entendimiento de su interacción precisa con todos los mecanismos existentes, tanto de virulencia del germen patógeno, como de defensa del huésped en la secuencia de eventos de la infección (Freter y Jones, 1983).

Mecanismos de adhesión de los microorganismos patógenos

1. Bacterias patógenas

En general, las adhesinas son pili (fimbrias) de la superficie de las bacterias Gram⁻, y son fibrillas de la superficie de las bacterias Gram⁺ (Beachey, 1981). Los pili pueden ser de dos clases: rígidos y flexibles; tienen un diámetro de 2 a 10 nm, y miden hasta 4 µm de largo. Son polímeros de proteínas, compuestos por subunidades

idénticas unidas por puentes de hidrógeno o por interacciones hidrofóbicas.

En general los receptores de las bacterias patógenas contienen carbohidratos; a veces es un sólo residuo el responsable de la adhesión y otras veces son cadenas de oligosacáridos (Beachey, 1981). La mayoría de los receptores conocidos contienen a los siguientes carbohidratos: Gal, GalNAc, GlcNAc, Man, Fuc y NeuNAc, que son de la configuración D-, excepto la L-fucosa (Tabla 1). La naturaleza de los receptores de las adhesinas bacterianas ha sido sugerida por el uso de los siguientes enfoques experimentales: 1) inhibición de la adhesión por carbohidratos o por lectinas de especificidad conocida; 2) inhibición de la adhesión por tratamiento enzimático específico del sustrato; 3) pérdida de la actividad de inhibidores complejos, después de que éstos han sido degradados y 4) inhibición de la adhesión por un receptor potencial ligado a una superficie inerte (Jones e Isaacson, 1983).

Bacterias que se adhieren al intestino

a. Escherichia coli enterotoxigénica (ECET). La presencia de adhesinas en cepas de ECET está asociada al serotipo O y a la producción de enterotoxina. Se han identificado ocho adhesinas en estas cepas de E. coli: 1) el antígeno factor de colonización (CFA/I) de cepas de humanos; hemaglutina (HA) GR de humano, bovino y pollo y también se adhiere a bordes de cepillo de intestino de conejo; 2) el CFA/II de cepas de humano, HA GR de bovino y pollo; 3) el pilus E8775 de cepas de humanos, HA GR de humano y bovino; 4) el antígeno K88 de cepas de humanos y cerdos, del cual se han identificado tres variedades serotípicas: K88ab, K88ac y K88ad; los antígenos K88ab y K88ac HA GR de cobayo y el K88ab además HA GR de pollo; 5) el antígeno K99 de cepas de cerdos, bovinos y carneros, HA GR de caballo y carnero; 6) el antígeno 987P de cepas de cerdos y conejos adultos, para el cual no se ha reportado un patrón específico de HA; 7) el antígeno F41 de cepas de cerdos y bovinos, HA GR de

humano grupo A, de cobayo, caballo y carnero y 8) el factor de adhesión (AF/R1) de la cepa RDEC-1 de conejos, para el que tampoco se conoce un patrón específico de HA. Para la cepa RDEC-1 también se ha sugerido la participación del antígeno K en la adhesión a células del epitelio de los folículos linfoides del intestino de conejo. La HA producida por todas estas adhesinas es resistente a manosa (MRHA), no se observa con bacterias cultivadas a temperaturas inferiores a 18°C, es eluida a 37°C y se destruye por calentamiento a 65°C por 30 min (Arbuthnott y Smyth, 1979; Beachey, 1981; Cantey et al., 1981; Cheney et al., 1983; Dean e Isaacson, 1982; de Graaf y Roorda, 1982; Deneke et al., 1984; Gaastra y de Graaf, 1982; Inman y Cantey, 1983 y 1984; Jones e Isaacson, 1983; Morris et al., 1982; Thomas et al., 1982).

El receptor de los antígenos CFA/I, CFA/II, K88, K99 y 987P es común, se localiza en el gangliósido GM₂ y su estructura activa es: GalNAc(β 1 → 4)[2 α NeuNAc]Gal(β 1 → 4)Glc-Cer. Se ha reportado inhibición de la adhesión de los antígenos CFA/I y K99 por NeuNAc y por el gangliósido GM₂; el antígeno K88 es inhibido por β-Gal, GalNAc, GlcNAc, Glc, Fuc, galactósidos, por el gangliósido GM₁ y por una glucoproteína con especificidad por GalNAc y GlcNAc (Beachey, 1981; Jones e Isaacson, 1983; Gaastra y de Graaf, 1982). Para el antígeno 987P se ha reportado un posible receptor que es sensible a la oxidación con peryodato y digestión con pronasa (Dean e Isaacson, 1982). Finalmente, se han descrito cinco fenotipos para los receptores del antígeno K88 en bordes de cepillo del intestino de cerdos: el A, que adhiere a los antígenos K88ab, K88ac y K88ad; el B, adhiere a K88ab y K88ac; el C, a K88ab y K88ad; el D, sólo al antígeno K88ad; y el E, a ninguno y es el que determina la resistencia natural a la infección bacteriana (Bulsma et al., 1982; Sellwood et al., 1975).

b. Vibrio cholerae. Tanto el flagelo como el antígeno O parecen estar involucrados en la adhesión (Arbuthnott y Smyth, 1979; Attridge y Rowley, 1983). Las cepas clásicas (Inaba u Ogawa) HA GR humanos, mientras que las cepas El Tor, HA GR de pollo. El receptor para

V. cholerae parece contener Fuc y Man; se ha reportado inhibición de la adhesión y de la HA por estos dos carbohidratos, por un digerido péptico de mucosa intestinal de conejo, L-fucósido, L-Gal, altas concentraciones de Fru, Glc y Sac y por glucoproteínas de la leche humana (Holmgren et al., 1983; Jones e Isaacson, 1983).

c. Otras bacterias intestinales. Se ha sugerido que el flagelo, el antígeno O y las fimbrias de tipo I de Salmonella typhimurium son responsables de su adhesión, mientras que para Shigella flexneri sólo son las fimbrias de tipo I; el receptor de ambas cepas contiene Man (Arbuthnott y Smyth, 1979; Jones e Isaacson, 1983). Aeromonas hydrophila, que también HA GR humanos parece tener seis mecanismos diferentes de adhesión inhibibles por: 1) Fuc, 2) Gal, 3) Man, 4) Fuc o Man, mediado por pili, 5) Fuc o Man, independiente de pili, y 6) Gal + Man (Atkinson y Trust, 1980).

Bacterias que se adhieren al aparato respiratorio

a. Mycoplasma pneumoniae. Su adhesión a células epiteliales ciliadas de la tráquea humana es mediada por la proteína P1, localizada en un organelo diferenciado de la superficie de la bacteria y que tiene un PM de 165,000; también se ha sugerido que otras proteínas con PM de 25,000 a 45,000 intervienen en la adhesión (Krause y Baseman, 1983; Leith y Baseman, 1984). Los receptores contienen residuos de NeuNAc y el receptor en los GR es la glicoforina (Banai et al., 1980; Baseman et al., 1982; Beachey, 1981; Jones e Isaacson, 1983). La adhesión es inhibida por sialoglucoproteínas humanas como la ceruloplasmina y el orosomucoide, así como por gangliósidos de cerebro de bovino (Chandler et al., 1982).

b. Otros micoplasmas. 1) Tanto la fracción de NeuNAc, como la fracción hidrofóbica de la glicoforina, son sitios activos receptores para el M. gallisepticum, patógeno de aves de corral (Banai et al., 1978). 2) M. pulmonis de roedores no tiene organelo de adhesión; su adhesión a linfocitos de bazo de rata y la HA de GR humanos

no es sensible a neuraminidasa, ni es inhibida por carbohidratos simples o complejos o por glucoproteínas, por lo que se ha sugerido la participación de interacciones hidrofóbicas en el mecanismo de adhesión (Minion et al., 1984). 3) M. hominis, M. salivarius y M. dispar se adhieren a células HeLa mediante receptores resistentes a neuraminidasa; los receptores de M. hominis y M. salivarius son sensibles a enzimas proteolíticas (Collier, 1983). 4) Los receptores de M. synoviae contienen residuos de NeuNAc (Collier, 1983).

Bacterias que se adhieren al aparato genitourinario

a. Escherichia coli uropatogénica (ECUP) sensible a manosa (MS). Se conoce una gran variedad de cepas de ECUP cuya adhesión y HA son MS, y de las que se han identificado las siguientes adhesinas: 1) las fimbrias de tipo 1 o pili comunes; 2) algunos antígenos K, como el K1, K2, K3, K12 y K13, que son polisacáridos; y 3) pili sensibles a hexosas, GlcNAc y NeuNAc. Estas adhesinas se adhieren a glucolípidos de las células epiteliales de la vejiga urinaria, de GR de cobayo, y a levaduras y glucoproteínas que contienen Man (Arbuthnott y Smyth, 1979; Beachey, 1981; Davis et al., 1981; Normark et al., 1983).

b. Escherichia coli uropatogénica (ECUP) resistente a manosa (MR). La presencia de adhesinas MR está asociada a los serotipos O, la producción de hemolisinas y colicina V, y la resistencia a la actividad bactericida del suero. La capacidad de las cepas ECUP-MR para adherirse a las células uroepiteliales, correlaciona con su capacidad para HA GR humanos en presencia de Man (MRHA). La adhesión del 90% de estas cepas es mediada por pili; 10% de las cepas son no-piliadas. Por otra parte, el 90% de estas cepas tienen la adhesina P; ésta adhesina reconoce a glucolípidos que contienen el siguiente disacárido: Gal(α 1 \rightarrow 4)Gal β -, determinante antigénico del sistema de grupos sanguíneos P. Esta estructura también se ha identificado en dos gangliósidos que están normalmente presentes en células uroepiteliales y GR humanos; la trihexosilceramida

y la globotetrosilceramida cuya estructura es: GalNAc(α 1 \rightarrow 3)GalNAc(β 1 \rightarrow 3)Gal(α 1 \rightarrow 4)Gal(β 1 \rightarrow 4)-Glc-Cer. El 10% restante de las cepas de ECUP-MR reconocen receptores diferentes al antígeno P, y estas especificidades se llaman colectivamente adhesinas X (Beachey, 1981; Jones e Isaacson, 1983; Labigne-Roussel et al., 1984; Normark et al., 1983). Existen además seis fimbrias (F7 a F12) en cepas de ECUP-MR, que son muy semejantes a las fimbrias de tipo 1 (MS; Klemm et al., 1983).

c. Neisseria gonorrhoeae. Se ha sugerido la presencia de pili que funcionan como efectores primarios de la adhesión de N. gonorrhoeae a células eucarióticas, y se ha involucrado a la proteína PII en etapas posteriores de la adhesión y la invasión (Sugasawara et al., 1983). La cepa P9 tiene pili α y γ implicados en la adhesión a células bucales epiteliales humanas y a células epiteliales de conjuntiva de Chang (Virji y Heckels, 1984). El receptor de estas adhesinas y de la cepa 201 tiene la siguiente estructura: Gal(β 1 \rightarrow 3)GalNAc(β 1 \rightarrow 4)Gal; la adhesión es inhibida por gangliósidos que contienen Gal (Beachey, 1981; Jones e Isaacson, 1983).

Bacterias que se adhieren a la mucosa oral y a los dientes

a. Streptococcus mutans. Esta bacteria posee dos mecanismos de adhesión; uno dependiente de polisacáridos y enzimas bacterianas, y el otro dependiente de proteínas.

1) La adhesión inicial por el primer mecanismo depende de la presencia de glucoproteínas de la saliva, las cuales forman una película delgada sobre el esmalte dental y promueven la agregación bacteriana. Cuando S. mutans se encuentra en presencia de sacarosa, produce abundantes polímeros de glucana y fructana; las glucanas son producidas por glucosiltransferasas (GT), que pueden ser constitutivas de la bacteria o encontrarse libres.

Para la adhesión de las bacterias se requiere la acción de las GT, las cuales son multivalentes, es decir, se unen a las glucanas y entre sí mismas y de esta manera promueven la agregación y forman

la placa dental. Por el metabolismo bacteriano se liberan ácidos que dañan el esmalte y promueven la caries dental (Fukushima et al., 1982; Inoue et al., 1982; Jones e Isaacson, 1983).

2) El mecanismo dependiente de proteínas implica la adhesión bacteriana a residuos de α -galactósidos y residuos básicos de las glucoproteínas salivales; se inhibe por Gal, Mel, α -galactósido y aminas. La adhesión es independiente de la síntesis de glucanas, aunque su presencia incrementa considerablemente la adhesión (van Houte, 1983).

b. Streptococcus sanguis. También la adhesión inicial es mediada por una película delgada de glucoproteínas salivales sobre el esmalte dental. Se han propuesto tres mecanismos diferentes para la adhesión de S. sanguis: 1) una proteína de la superficie con PM de 70,000 a 90,000; 2) adhesinas específicas por NeuNAc; y 3) el ácido lipoteicoico. Las interacciones parecen ser de tres tipos: iónicas, hidrofóbicas y tipo lectina. Esta última depende de la secuencia de carbohidratos NeuNAc(α 2 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 3)GalNAc, es inhibida por tratamiento del sustrato con neuraminidasa, y por compuestos que contienen residuos de NeuNAc (Liljemark y Bloomquist, 1981; Morris y McBride, 1984; Murray et al., 1982, citado por Morris y McBride, 1984).

c. Streptococcus salivarius. Coloniza principalmente la parte dorsal de la lengua, el epitelio bucal y en ocasiones la superficie dental mediante componentes de la saliva. Se han aislado dos proteínas asociadas a la pared celular; el antígeno b, que tiene un PM de 320,000 y el antígeno c, formado por tres glucoproteínas con PM de 220,000 a 280,000 (Weerkamp y Jacobs, 1982).

d. Streptococcus pyogenes. La adhesión es mediada por el ácido lipoteicoico; la parte activa de la molécula es la fracción de ácidos grasos que forma complejos con la proteína M de la bacteria; de esta manera, la fracción lipídica puede estar tanto en la membrana como fuera de la bacteria para interaccionar con los receptores.

En células epiteliales bucales humanas, estos receptores parecen ser proteínas o glucoproteínas que contienen sitios de unión para ácidos grasos, similares a los de la albúmina (Beachey, 1981).

e. Actinomyces. En cepas de A. viscosus y A. naeslundii de humanos, se ha encontrado una lectina que participa en la adhesión de estas bacterias a células epiteliales bucales humanas y en la coagregación con algunas cepas de S. sanguis en la placa dental. Dicha lectina está asociada a pili que tiene dos antígenos (1 y 2); la actividad está relacionada con el antígeno 2, y es inhibida por Lac, metil- β -galactósido y GalNAc, pero no por metil- α -galactósido, celobiosa, GlcNAc, Fuc o Man, por lo que se sugiere que la unión β -glucosídica es la responsable de la actividad de esta lectina en la adhesión (Brennan et al., 1984; Revis et al., 1982).

2. Bacteriófagos y virus animales

Bacteriófagos

Se han identificado sitios bacterianos de unión para varios fagos; un residuo Gal-1- α -Man para el fago E¹⁵, un grupo O-acetilo para el fago G341, Glc ligada a heptosa para el fago P1, GlcNAc para el fago Félix O. Es interesante que la gran mayoría de fagos son semejantes a las lectinas en su especificidad por ciertas conformaciones de sacáridos. Los fagos de cadena sencilla de RNA (Q β , MS2, R17) se unen específicamente a los lados de los pili F, mientras que los fagos de DNA de cadena sencilla se unen al extremo de los pili (Greaves, 1975). En el sistema E. coli-T5 el lipoglicopéptido es el receptor para el virus; compuestos similares se combinan con los fagos T2, T3, T4, T6 y T7. El sitio receptor para el fago 77 de Staphylococcus aureus es un mucopéptido (Rosato y Cameron, 1964).

Virus animales

Los virus animales tienen un espectro de huésped selectivo y su penetración implica receptores celulares que parecen ser glucoproteínas. El sitio de unión del adenovirus tipo 2 para células HeLa es una glucoproteína con PM de 40,000 a 42,000, que se localiza en los doce vértices del virión (Svenson et al., 1981). Se han propuesto dos mecanismos para la infección de monocitos humanos por el virus del dengue; receptores celulares sensibles e insensibles a tripsina; éste último es un receptor Fc (Daughaday et al., 1981). Los virus de la encefalomiocarditis y de la influenza HA GR humanos; las sialoglucoproteínas, especialmente la glicoforina A, son sitios receptores y la parte activa es el NeuNAc (Burness y Pardoe, 1981). La proteína VP₁ es la adhesina de los virus de tipo A₁₂ que producen la enfermedad de pies y boca (Baxt et al., 1984).

3. Hongos

Candida albicans

Los informes acerca de los mecanismos adhesivos de hongos son escasos. La mayoría se refiere a C. albicans, patógeno oportunista que coloniza frecuentemente las superficies mucosas humanas. Se ha sugerido la presencia de moléculas con Man, tanto en la superficie de este hongo como en las células epiteliales bucales humanas, en el mecanismo de adhesión (Sandin et al., 1982). Por parte de C. albicans se ha propuesto a una manoproteína y en las células epiteliales a una glucoproteína; la adhesión es inhibida por tratamiento de las levaduras y células con α -manosidasa, papaína, tripsina y quimiotripsina (Lee y King, 1983; Sobel et al., 1981).

Cryptococcus neoformans

Este hongo es otro de los pocos patógenos para los que se ha establecido un factor de virulencia: el polisacárido capsular.

El hongo resiste la fagocitosis si tiene el polisacárido, se cree que por impedir la adhesión de fagocitos (Krozel, 1977).

4. Protozoarios parásitos

Plasmodia

Dos interacciones independientes contribuyen a la endocitosis de éstos parásitos por los GR. La primera interacción es la adhesión pasiva y sin orientación específica del parásito en la membrana del GR; es reversible y está mediada por uniones débiles. La segunda interacción es la invasión, que involucra la formación de una adhesión fuerte, orientación específica del parásito por su extremo apical en la membrana del GR y un marcado rearrreglo del citoesqueleto del GR (Friedman et al., 1984).

a. Plasmodium falciparum. Se ha sugerido que las sialoglucoproteínas, principalmente la glicoforina, participan en la primera interacción o adhesión de los GR humanos con los merozoítos; la adhesión es inhibida por tratamiento del GR con neuraminidasa y tripsina (Friedman et al., 1984). En la segunda interacción o invasión interviene la banda 3 del GR; las porciones activas son las cadenas laterales de polilactosamina (polímeros de Gal y GlcNAc) de la eritroglicana de esta proteína (Friedman et al., 1985).

b. Plasmodium vivax. El grupo sanguíneo Duffy parece ser el receptor en el GR; la mayoría de los africanos son inmunes a este parásito, lo cual parece deberse al hecho de que son del tipo Fy a⁻b⁻; es decir, no poseen el determinante antigénico del grupo sanguíneo Duffy (Allen, 1984).

c. Plasmodium knowlesi. Invade GR humanos y Rhesus. No requiere NeuNAc para la invasión y el tratamiento con pronasa y quimiotripsina inhiben la adhesión (Greaves, 1975). Para los GR humanos el antígeno

Duffy parece estar implicado en la adhesión inicial, y para la invasión de GR Rhesus la banda 3 parece ser la responsable, ya que anticuerpos monoclonales contra esta proteína inhiben la invasión, pero no la adhesión (Miller *et al.*, 1983).

Leishmania

Los mecanismos que se han propuesto son dos; uno de tipo lectina y otro mediado por complemento. Se propone que los promastigotes (forma extracelular flagelada, infectante) activan al complemento; la proteína C5a sirve por una parte, como un agente quimiotáctico para los macrófagos, y por la otra, como un ligando, ya que se une al promastigote y al receptor para el complemento de la superficie del macrófago (Bray, 1983).

a. Leishmania tropica. La interacción de los amastigotes (forma intracelular no flagelada) con monocitos humanos de sangre periférica depende de proteínas o glucoproteínas de ambas superficies. El pretratamiento del parásito con tripsina, quimiotripsina, pronasa y neuraminidasa, inhibe la adhesión; el pretratamiento con β -galactosidasa produce un incremento en la capacidad de adhesión a los monocitos. El pretratamiento de los monocitos con pronasa y quimiotripsina inhibe la adhesión de amastigotes no tratados (Wyler y Suzuki, 1983).

b. Leishmania mexicana mexicana. Los promastigotes contienen un ligando similar a la aglutinina de germen de trigo, que reconoce a un receptor con GlcNAc de la superficie del macrófago. Este receptor es sensible a tripsina, citocalasina B y glutaraldehído. El pretratamiento del promastigote con enzimas proteolíticas descubre un receptor para un componente del suero que se une a un receptor Fc de la superficie del macrófago (Bray, 1983).

c. Leishmania mexicana amazonensis. Por microscopía electrónica se ha estudiado la adhesión de las formas intracelulares de este

parásito a la membrana de la vacuola fagocítica del macrófago. Se ha observado un rearreglo de las partículas intramembranales en las zonas de contacto que semejan una unión comunicante (Benchimol y De Souza, 1981).

Trypanosoma congolense Broden

Los sitios de unión se encuentran en la parte apical del parásito, son proteínas sensibles a tripsina y quimiotripsina y reconocen residuos de NeuNAc en GR de bovino, carnero y cabra (Banks, 1979).

Giardias

Para Giardia muris y Giardia duodenalis se ha sugerido la participación de proteínas contráctiles del citoesqueleto en el mecanismo de adhesión a bordes de cepillo de intestino. La actina, α -actinina, miosina y tropomiosina, que se encuentran en la periferia del disco ventral, en la cresta lateral del disco ventral y en los axonemas del flagelo postero-lateral, parecen estar involucradas en tres mecanismos de adhesión propuestos y que aún requieren verificación experimental: 1) actividad flagelar, 2) adhesión por el flanco ventrolateral y 3) deslizamiento de microtúbulos (Feely et al., 1982).

De la serie de antecedentes que se acaban de mencionar acerca de los mecanismos de adhesión de los microorganismos patógenos, se puede concluir lo siguiente:

1) de manera similar a lo que ocurre en la adhesión intercelular, los mecanismos de adhesión de los microorganismos patógenos son múltiples y complejos. Un germen patógeno o una célula huésped dados pueden tener varios mecanismos para la adhesión y estos pueden

además ser compartidos; un receptor puede ser funcional para diferentes microorganismos patógenos.

2) Las glucoproteínas y los glucolípidos son los receptores más comunes y la especificidad de la adhesión está determinada por combinaciones especiales de los carbohidratos presentes en estas moléculas, que además contienen a los azúcares más comunes en los seres vivos. En general, los receptores son cadenas de oligosacáridos; rara vez es un solo residuo de carbohidrato el responsable de la adhesión.

3) Finalmente, los determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos también participan de manera importante en la adhesión de los microorganismos patógenos.

F. Grupos sanguíneos implicados en la adhesión de microorganismos patógenos

Como se describió anteriormente, se sabe que el grupo sanguíneo (GS) participa en la adhesión de algunos microorganismos patógenos: el GS humano A, en la adhesión del antígeno F41 de ECET (Gaastra y de Graaf, 1982); los GS M y P en la adhesión de algunas cepas de ECUP (Labigne-Roussel et al., 1984); y el antígeno Duffy en la adhesión de algunos plasmodia (Miller et al., 1983). Los caracteres de los GS son transmitidos por herencia mendeliana simple, y los determinantes antigénicos, que son producto de genes alélicos o interrelacionados, han sido clasificados dentro de diversos sistemas de GS específicos. A continuación describiremos el sistema de grupos sanguíneos ABO, de gran interés en este trabajo.

Sistema ABO

Existen tres especificidades de GS en el mecanismo ABO detectables tanto en los GR como en las secreciones y líquido tisulares: A, B, H. En el GR estas sustancias son glucolípidos y en las secreciones

son glucoproteínas. Los glucolípidos activos contienen ácidos grasos, esfingosina, Glc y tres carbohidratos más que determinan la mayoría de las especificidades de cada GS: Gal, GalNAc y L-Fuc. Las glucoproteínas de las secreciones tienen un PM promedio de 2×10^5 - 10^6 , 85% de carbohidratos, 15% de aminoácidos y contienen los tres carbohidratos señalados. En la Tabla 2 se muestran las diferencias en los carbohidratos, que determinan las especificidades de estos GS. Como puede observarse, existe una molécula precursora que es modificada sucesivamente en el extremo no reductor, lo cual determina cada una de las especificidades descritas. Un residuo α -Fuc es el determinante específico H; también puede observarse que la única diferencia que determina las especificidades de las sustancias A y B, es el grupo acetamido del átomo de carbono 2 de GalNAc y que distingue a este azúcar de Gal. Las sustancias A y B no se encuentran en las secreciones, a menos que estén presentes en el GR, pero 20% de los individuos que sí tienen estos GS en el GR no secretan la sustancia correspondiente. La secreción está controlada por un par de genes alélicos: Sese, heredados en forma independiente de los genes ABO y que no influyen en la expresión de estos genes en el GR. Los caracteres SeSe y Sese resultan en secreción; sese resulta en no secreción. El material activo H depende de los genes alélicos Hh; esta es la sustancia que bajo la influencia de los genes A y B se transforma en sustancias activas A y B, respectivamente (Tabla 2). Para cada grupo sanguíneo se han descrito muchos determinantes antigénicos en los GR. Los del sistema ABO son los siguientes: A, B, H, A₁, A₂, AEL, AEND, AM, AX, AY, B3, BEL, BX (Allen, 1984; Watkins, 1966).

G. Entamoeba histolytica

E. histolytica es la especie del género Entamoeba que mejor se conoce. Es uno de los protozoarios que con mayor frecuencia parasitan al humano, en el que causan la disentería amibiana o amibiasis.

TABLA 2. Estructuras parciales de las cadenas de
carbohidratos de los grupos sanguíneos ABH^a

Substancia	Estructura
Precursor	Gal(β 1 \rightarrow 3)GlcNAc(β 1 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 3)GalNAc
H	Gal(β 1 \rightarrow 3)GlcNAc(β 1 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 3)GalNAc Fuc(α 1 \rightarrow 2)
A	GalNAc(α 1 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 3)GlcNAc(β 1 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 3)GalNAc Fuc(α 1 \rightarrow 2)
B	Gal(α 1 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 3)GlcNAc(β 1 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 3)GalNAc Fuc(α 1 \rightarrow 2)

^aEl enlace entre Gal y GlcNAc es (β 1 \rightarrow 3) para las cadenas tipo 1, y (β 1 \rightarrow 4) para las de tipo 2.

1. Historia

El parásito E. histolytica fué encontrado y descrito por primera vez por Lesh en 1875, quien lo aisló de un paciente ruso con disentería crónica, en la provincia de Arcángel, cerca del círculo polar Artico.

Fué doce años después cuando debido al trabajo de varios investigadores, principalmente Kartulis, que se demostró el papel patógeno de este parásito. En 1891 Councilman y Lafleur dieron una descripción clínica y patológica detallada de la disentería amibiana. Por otra parte, en 1913 Walker y Sellards demostraron conclusivamente, que E. coli era una especie no patógena y que E. histolytica sí lo era (Martínez-Palomo, 1982).

Durante la década pasada, hubo un gran auge en el número de investigaciones sobre amibiasis debido a varios factores: 1) el conocimiento de la necesidad de estudiar los aspectos básicos de la biología de este parásito potencialmente letal; 2) el establecimiento de centros multidisciplinarios para el estudio de la amibiasis, en Africa del sur por Elsdon-Dew y en México por Sepúlveda; y 3) la introducción del cultivo axénico de E. histolytica por Diamond en 1968. Como resultado de la investigación sobre amibiasis, se ha obtenido información acerca de la estructura fina, bioquímica, cultivo in vitro y diferencias entre cepas de E. histolytica. De manera similar el análisis de los factores de virulencia, ha proporcionado información de el mecanismo por el cual las amibas invaden y destruyen los tejidos mientras soportan la respuesta inmune del huésped (Martínez-Palomo, 1982).

2. Clasificación

La clasificación taxonómica de E. histolytica es la siguiente (Honigberg et al., 1964):

Phylum: Protozoa
Subphylum: Sarcomastigofora
Superclase: Sarcodina
Clase: Rhizopoda
Subclase: Lobosia
Orden: Amoebida
Género: Entamoeba
especie: E. histolytica

3. Morfología

E. histolytica presenta dos fases durante su ciclo vital; una activa de crecimiento y reproducción representada por el trofozoíto y otra quística a través de la cual se disemina la infección.

El trofozoíto es una célula altamente dinámica, cuya forma y movilidad son muy sensibles a los cambios medioambientales. Su tamaño varía entre 7 y 40 μm de diámetro. Su citoplasma está bien diferenciado en un endoplasma granuloso y un ectoplasma hialino. Se caracteriza por formar pseudópodos en su superficie, tener un núcleo prominente con cromatina periférica fina y un endosoma central, abundantes vacuolas y vesículas embebidas en la matriz citoplásmica, gránulos de glucógeno y polirribosomas (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1982).

El quiste es generalmente esférico. Su tamaño varía entre 5 a 20 μ de diámetro y está recubierto por una pared hialina. Contiene de uno a cuatro núcleos vesiculares prominentes con endosomas más o menos centrales. Presenta barras cromatoidales alargadas, compuestas por ácido ribonucléico y glucógeno (Cheng, 1978).

4. Ciclo biológico

E. histolytica vive en el intestino grueso del humano, en cuya luz se encuentran los trofozoítos que en ocasiones pueden invadir a la mucosa, ingiriendo las células epiteliales. En el interior de la mucosa producen úlceras, y tales ulceraciones de

la pared intestinal pueden originar cuadros de disentería amibiana o bien un daño muy localizado sin manifestaciones clínicas. En ocasiones las amibas penetran a los capilares y se transportan en la corriente sanguínea a distintas zonas del cuerpo; el hígado, los pulmones y en ciertas ocasiones al cerebro. Las amibas que permanecen en la luz del intestino pueden ser expulsadas en heces líquidas o semilíquidas en tanto que son todavía trofozoítos, o bien pueden redondearse y ser expulsados como quistes, por medio de los cuales se disemina la infección (Markell y Voge, 1984).

Cuando un quiste viable penetra en el intestino grueso se lleva a cabo el exquistamiento, emergiendo una amiba tetranucleada denominada metaquistica, que mediante una serie de divisiones nucleares y citoplásmicas da origen a ocho amébulas uninucleadas o trofozoítos jóvenes que posteriormente crecen. Los trofozoítos se dividen por bipartición formando amibas pequeñas conocidas como formas prequisticas que posteriormente secretan una pared resistente y se enquistan (Kudo, 1979).

5. Epidemiología

E. histolytica se encuentra ampliamente difundida en todas las áreas del mundo, lo mismo en regiones tropicales que subtropicales y templadas, aunque es más prevalente en las regiones cálidas (Kudo, 1979). Por tal motivo, se considera que la amibiasis es la más cosmopolita de todas las enfermedades parasitarias (Markell y Voge, 1984). Sin embargo, tratándose de cualquier región, la amibiasis es más frecuente en los sitios donde predomina el hacinamiento y las malas condiciones de sanidad.

México es uno de los países que presenta una de las más altas prevalencias de amibiasis, siendo ésta "la enfermedad parasitaria más importante que se encuentra entre los principales problemas de salud pública, tanto por su frecuencia como enfermedad y las pérdidas económicas que origina" (Biagi, 1976).

La amibiasis en México ocupa el cuarto lugar como causa de muerte (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970); provoca defunciones en niños

y adultos jóvenes en la etapa productiva de la vida (Biagi, 1976).

6. Adhesión de los trofozoítos

La adhesión de los trofozoítos de E. histolytica a células animales también ha sido estudiada mediante diversos enfoques experimentales que se describen a continuación.

Estudios microscópicos

Griffin (1972) estudió biopsias de lesiones amebianas del colon de pacientes con disentería; analizó tanto la mucosa colónica como el contenido del lumen del colon y describió que las amebas rara vez se vieron en contacto directo con la mucosa, pero las observó en contacto con GR y células inflamatorias.

Takeuchi y Phillips (1975) estudiaron en cobayos libres de gérmenes, la infección intestinal por trofozoítos de E. histolytica aislados de un paciente con colitis amebiana aguda y mantenidos en cultivo mixto por largo tiempo; a los 7-12 días después de la inoculación, encontraron amebas en contacto más o menos estrecho con las células del epitelio interglandular o con el epitelio de las criptas. Este contacto produjo progresivamente un aplanamiento y desaparición de las microvellosidades intestinales, separación de las células que estuvieron en contacto con las amebas, producción de espacios por los cuales las amebas invadieron el epitelio interglandular y posteriormente el epitelio de las criptas, hasta llegar a la lámina propia.

Mora Galindo et al. (1978) realizaron experimentos de interacción entre trofozoítos de E. histolytica y láminas epiteliales de mucosa cecal de cobayos; encontraron que durante los 30 min iniciales de incubación, los trofozoítos se adhirieron en mucho menor número a la región luminal del epitelio que a la región basal de las láminas y a partir de los 30 min sólo parecieron penetrar las láminas epiteliales a través de las regiones interglandulares en los sitios

de descamación celular. Concluyeron que los trofozoítos se adhieren primero a las zonas de descamación del epitelio interglandular para después invadirlo.

Posteriormente Mora Galindo et al. (1982) realizaron un estudio cinético con el mismo sistema experimental pero aislaron a la mucosa cecal en cámaras de Ussing; encontraron que a los 30 min de interacción los trofozoítos se adhirieron indistintamente al epitelio interglandular o al epitelio de las criptas. A los 40 min, el 90% de los trofozoítos se adhirió al epitelio interglandular y después de 60 min la mayoría de ellos se localizó en microulceraciones del epitelio interglandular. En todo el estudio las criptas permanecieron intactas.

Treviño-Manzo et al. (1978) observaron que después de siete días de haber inoculado trofozoítos de E. histolytica en el ciego de cobayos recién nacidos, aquellos rara vez se encontraban adheridos a la superficie epitelial del borde libre de las microvellosidades intestinales, pero en cambio parecían haberse desplazado hacia la profundidad de las glándulas colónicas ocupando así toda su luz y poniéndose en contacto con las células del epitelio y posteriormente con la lámina propia.

McCaul y Bird (1977) analizaron por microscopía electrónica de barrido la morfología de la superficie de amibas adheridas al vidrio de cubreobjetos en donde los trofozoítos fueron cultivados; observaron microfilopodios tanto en los bordes como en las superficies inferiores de contacto.

González-Robles y Martínez-Palomo (1983) también estudiaron por microscopía electrónica de barrido la morfología de trofozoítos de E. histolytica sobre superficies de plástico y células MDCK. Encontraron diferencias cuantitativas en la morfología de trofozoítos de diferentes cepas y un incremento en las especializaciones de la superficie de los parásitos cuando estaban asociados con bacterias (estomas endocíticos y filopodios); la superficie basal involucrada en la adhesión al sustrato sólo mostró filopodios pequeños en el borde externo.

Kobiler y Mirelman (1981) estudiaron la adhesión de trofozoítos de E. histolytica a monocapas de una línea epitelial de intestino humano (Henle 407-CCL6) y encontraron los siguientes cambios en la superficie de los trofozoítos adheridos: invaginaciones endocíticas en la superficie, vesiculaciones protruyentes, pseudópodos y lo que parecieron ser tubos pseudopodiales. Después de 15 min de interacción, se formaron filopodios que adhirieron a las amibas a la monocapa y formaron conexiones estables con ésta.

Adhesión a monocapas, GR y leucocitos

Knight (1977), Knight et al. (1974) y McCaul y Bird (1977) han estudiado la interacción entre trofozoítos de E. histolytica y monocapas de células de riñón de conejo (RK13), y observaron que se requiere el contacto entre los trofozoítos y la monocapa para que ésta se dañe. El daño celular progresivo consistió en el alargamiento de las microvellosidades, erosión de la superficie celular y desaparición de las células.

Eaton et al. (1970) hicieron experimentos de interacción entre los trofozoítos y las líneas celulares RK13, de hígado de Chang y HeLa; describieron que el efecto citolítico fué dependiente del contacto y propusieron la existencia de organelos (lisosomas) que contenían enzimas responsables de la citólisis a los que llamaron "lisosomas activos de superficie" o "gatillos de superficie".

Orozco (1978) ha sugerido que la adhesión de las amibas a cultivos de hepatocitos y de células MDCK precede al daño celular y éste a la fagocitosis de las células blanco. También ha encontrado que la velocidad de adhesión de diferentes cepas amibianas a GR y monocapas de células MDCK es semejante y no tiene relación con la virulencia amibiana (Orozco, 1981).

Ravdin et al. (1980) también han sugerido que el efecto citopático de las amibas se lleva a cabo en tres etapas: contacto, efecto citoletal y fagocitosis. Las citocalasinas A, B y D inhiben la

destrucción de las células CHO, lo que sugiere la participación de microfilamentos en el daño dependiente de contacto.

Jarumilinta y Kradolfer (1964) estudiaron la interacción entre trofozoítos de E. histolytica y leucocitos de humano, carnero, cobayo, conejo, hámster, pollo, rata y ratón; encontraron que la adhesión de las amibas a los leucocitos produce en éstos un daño progresivo que se lleva a cabo en 2 a 10 min y consiste en disminución de la movilidad y actividad de la superficie de los leucocitos, degranulación, licuefacción del citoplasma, redondeamiento del núcleo, salida de material citoplásmico y muerte; la membrana celular pareció no sufrir cambios.

Guerrant et al. (1981) analizaron también la interacción entre amibas y leucocitos polimorfonucleares humanos y encontraron que la citólisis ocurría después del contacto. Al incubar a la cepa HM-1 (de mayor virulencia) con los leucocitos observaron una rápida destrucción de los mismos, aún con una relación de 1000 leucocitos por amiba; encontraron resultados opuestos al mezclar a la cepa 303 (de menor virulencia) con 300 leucocitos por amiba.

Caracterización de la adhesión

Michel y Hohman (1979) estudiaron la influencia de colchicina, vinblastina y citocalasina B sobre la adhesión de E. histolytica a superficies de vidrio; sus resultados sugieren que la adhesión está mediada al menos parcialmente por microfilamentos contráctiles del citoesqueleto, sensibles a citocalasina B.

Gillin y Diamond (1980) estudiaron los requerimientos orgánicos para la adhesión a vidrio, alargamiento y movilidad de los trofozoítos de E. histolytica; propusieron un medio definido de mantenimiento, el MM-1, que no permite el crecimiento de las amibas pero las mantiene vivas, adherentes y móviles durante 12 a 24 horas. El Tris-HCl fué para ellos el mejor amortiguador (pH óptimo 6.9 a 7.0); encontraron además un requerimiento absoluto y altamente específico de cisteína

y ácido ascórbico. Estudiaron también los efectos de la cisteína y de la tensión de oxígeno sobre la adhesión de los trofozoítos al vidrio, la adhesión fué mayor en la fase logarítmica de crecimiento y requirió cisteína, la cual aumentó la velocidad de adhesión durante las 2 horas iniciales de incubación y protegió la viabilidad de los trofozoítos en presencia de oxígeno.

Kobiler y Mirelman (1981) caracterizaron la adhesión de trofozoítos de E. histolytica a la línea celular de intestino humano, Henle 407-CCL6. Encontraron que la adhesión fué óptima a los 15 min de incubación a 35-37°C, y que hubo una correlación lineal entre la adhesión y la concentración de trofozoítos hasta con 1 amiba/célula epitelial. La adhesión dependió del pH y la fuerza iónica (FI); a pH 5.7 la adhesión no se modificó cuando se cambió la FI del medio (con amortiguador de fosfatos 0.2, 2 o 20 mM); a pH 7.4 la adhesión fué similar a la observada con un pH de 5.7 y fosfatos 0.2 a 2 mM, pero disminuyó tres veces con fosfatos 20 mM. La fijación de la monocapa con glutaraldehído no afectó la adhesión, pero ésta sí fué inhibida al fijar a las amibas. La adhesión fué similar en ensayos realizados con rotación constante (75 rpm) durante 15 min, que en condiciones estacionarias durante 30 min; fué mayor con trofozoítos de fase logarítmica que de fase estacionaria, y similar para dos cepas de E. histolytica; fué inhibida por citocalasina B (1×10^{-5} M), temperaturas menores de 5°C, EDTA y EGTA (10 mM). Concluyeron que la amiba tiene en su superficie un microambiente ácido, que sólo se afecta por amortiguadores fuertes; estos modifican el pH de la superficie e inhiben la adhesión. Sugirieron además que la adhesión depende de microfilamentos y que el componente responsable de la misma está en la amiba.

Cano-Mancera (1981) y López-Revilla y Cano-Mancera (1982), han caracterizado y definido las condiciones óptimas para la adhesión de trofozoítos de E. histolytica a GR humanos en suspensión. Desarrollaron un medio salino: salino-HEPES (HEPES 20 mM, glucosa 5.5 mM, NaCl 120 mM, CaCl₂ 4 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7.3) y bajo estas condiciones encontraron que la adhesión amibiana a los GR es muy eficiente, ya que la mayoría de las amibas formaron complejos con los GR después

de sólo 5 min a 37°C, en mezclas que se mantuvieron con agitación constante (30 ciclos/min) y que contenían 10^4 amibas y 10^6 GR por ml. La velocidad de adhesión dependió de las concentraciones de amibas y GR, pero no de los grupos sanguíneos mayores ABO. La adhesión se inhibió si los trofozoítos eran fijados con glutaraldehído, pero sólo disminuyó ligeramente si los GR estaban previamente fijados; también disminuyó en ausencia de glucosa y fue inhibida en función de la concentración de citocalasina B (DI_{50} : 3×10^{-7} M) y de los inhibidores metabólicos batofenantrolina y 8-hidroxiquinoleína. De éstos resultados concluyeron que la adhesión de E. histolytica es un proceso activo que depende del citoesqueleto amibiano, de la producción de energía metabólica y de la movilidad de ligandos de superficie, tanto de la amiba como del GR.

Posibles mecanismos de adhesión

Kobiler y Mirelman (1980) encontraron una actividad de lectina en extractos totales y una fracción membranal de varias cepas de E. histolytica que aglutina GR de humano grupos sanguíneos ABO, carnero, cobayo, conejo y rata. Esta actividad es dependiente de pH (5.7-6.0); sensible a la temperatura (100°C por 10 min, 37°C por 2 h o 4°C por varias horas); sensible a la oxidación (prevenida con β -mercaptoetanol 5 mM) y a la proteólisis (prevenida con PMSF 5 μ M); no parece correlacionar con la virulencia, ya que la actividad es mayor en las cepas HSC y HK-9 (de menor virulencia), que en las cepas 200 y HM-1 (de mayor virulencia). El 50% de la actividad hemaglutinante (HA) es inhibida por oligosacáridos de quitina, principalmente el trímero y tetrámero de GlcNAc (25 μ M), lo que sugiere el requerimiento de al menos dos unidades de GlcNAc; también es inhibida por GlcNAc pero a una concentración > 50 mM, y no es inhibida por otros monosacáridos, disacáridos o aminoazúcares.

También Kobiler et al. (1981) han reportado que la actividad de lectina es inhibida por suero de bovino (0.1%) y macromoléculas que contienen GlcNAc, como quitina (2.5 μ g/ml), moco del colon

de conejos (50 $\mu\text{g/ml}$), IgA de calostro humano (50 $\mu\text{g/ml}$) y subunidades de peptidoglicano que contienen GlcNAc-NeuNAc (100 $\mu\text{g/ml}$); asimismo por IgG de suero de pacientes con anticuerpos antiamebianos.

Kobiler y Mirelman (1981) encontraron que la adhesión de E. histolytica a monocapas de la línea celular Henle 407-CCL6, fué inhibida por quitina (0.2 mg/ml), peptidoglicano (1 mg/ml), IgA de calostro humano (5 mg/ml) y por el trímero (1 mg/ml) y tetrámero (0.2 mg/ml) de GlcNAc; la aglutinina de germen de trigo (específica por GlcNAc y NeuNAc) inhibió 50% la adhesión (1 mg/ml). Al preincubar la monocapa con una fracción membranal amibiana enriquecida con la actividad de lectina (1 mg de proteína/ml), se inhibió el 40% de la adhesión. Sueros inmunes descomplementados o la fracción de IgG del suero de pacientes con historia de amebiasis inhibieron la adhesión y existió correlación entre el grado de inhibición y la concentración de anticuerpos específicos contra la lectina. La adhesión a GR fué inhibida por oligosacáridos de quitina (0.2 M) y la adhesión a secciones de colon de cobayo fué inhibida por bajas concentraciones de suero, peptidoglicano, quitina y los oligosacáridos de quitina; no hubo inhibición de la adhesión a las monocapas ni a GR por GlcNAc, GalNAc, NeuNAc u otros glucoconjugados.

Por toda la serie de datos que acabamos de mencionar, estos autores han sugerido que la lectina amibiana podría participar en la adhesión a células animales (Mirelman y Kobiler, 1981).

Orozco et al. (1982) estudiaron la adhesión de trofozoítos de E. histolytica a monocapas de células MDCK y láminas epiteliales de intestino de cobayo; describieron que la adhesión de varias cepas amebianas fué semejante y no hubo diferencias en la adhesión de las amebas a monocapas intactas o fijadas con glutaraldehído. La preincubación de las amebas con GlcNAc₂ (2 mg/ml) inhibió al 50% la adhesión y el efecto citopático; otros compuestos como GlcNAc, α -metil-manósido (m-Man), almidón o concanavalina A, no tuvieron efecto inhibitorio sobre la adhesión o destrucción de las monocapas. Sugirieron que la actividad de lectina descrita por Kobiler y Mirelman (1980) podría participar en la adhesión, que la virulencia de las

cepas se expresa en un evento posterior a la adhesión (citólisis y fagocitosis), y que la movilidad de los receptores celulares no es requerida para la adhesión. De manera similar, Orozco et al. (1982) y García-Rivera et al. (1982) analizaron la adhesión de algunas cepas y clonas de E. histolytica a GR y monocapas de células Henle 407-CCL6. La adhesión de las clonas fué aproximadamente el 10% de la observada para las cepas de E. histolytica; estas clonas también mostraron una disminución en la capacidad de fagocitosis, destrucción de las monocapas, producción de abscesos hepáticos y en la actividad de la lectina descrita. La fagocitosis de GR correlacionó con la virulencia de las cepas y fué inhibida al preincubar los trofozoítos con GlcNac₂ y GlcNac₂₋₃. No encontraron inhibición de la adhesión o la fagocitosis por GlcNac, Glc, m-Man o Sac.

Bracha et al. (1982) y Bracha y Mirelman (1983) han estudiado la adhesión de E. histolytica a bacterias, y han propuesto la existencia de dos mecanismos de adhesión: uno dependiente de Man y otro dependiente de una actividad de lectina específica por GalNac. La adhesión de E. coli 7343 y Serratia marcescens (bacteria MS) a la amiba es inhibida por m-Man (0.5%) y por preincubación de las amibas con concanavalina A; la adhesión se observa con bacterias y amibas intactas o fijadas con glutaraldehído. La adhesión de Shigella flexneri y Staphylococcus aureus (bacteria MR) se observa al preincubar las bacterias con concanavalina A y es inhibida por m-Man. Al opsonizar a estas dos especies bacterianas con antisueros específicos, también es posible observar su adhesión a las amibas; ésta no parece depender de receptores Fc pi para el complemento, ya que existe con fragmentos Fab, suero descomplementado y en presencia de EDTA, pero es inhibida por citocalasina B y a 5°C. Los oligosacáridos de quitina (5 mg/ml), peptidoglicano (1 mg/ml), Gal (10 mg/ml), GalNac (1 mg/ml) y Lac (20 mg/ml) inhibieron la adhesión, pero no hubo efecto inhibitorio por Man o Glc. E. coli 055 y Salmonella greenside 050 (bacteria MR) no opsonizadas, también se adhieren a la amiba; la adhesión es inhibida por fijación de los trofozoítos con glutaraldehído, Gal (10 mg/ml), Lac (10 mg/ml), tiodigalactósido, GalNac (10 mg/ml), asialofetuína (1 mg/ml) y lipopolisacárido de E. coli 055 (4 mg/ml). No existe inhibición de la adhesión de estas bacterias por Man ni por oligosacáridos de quitina.

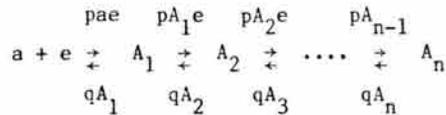
Ravdin y Guerrant (1981) estudiaron la adhesión de E. histolytica a células CHO y GR de humano, bovino y carnero. La adhesión, citólisis y fagocitosis fueron inhibidas por las citocalasinas B y D (50% de inhibición con 2×10^{-5} M), y a 4°C. La adhesión no requirió cationes divalentes; fue similar con GR humanos de los GS ABO, y el doble de la observada con GR de bovino y carnero; no dependió de receptores Fc ni para el complemento; tampoco fué afectada por tratamiento de las amibas con tripsina. Existió 50% de inhibición de la adhesión a células CHO con GalNac (4.5 mM), Gal (15 mM) y D-Fuc (180 mM), después de 2 horas de incubación a 4°C; la inhibición fué observada al preincubar a las amibas, pero no a las células CHO con GalNac y fué reversible con GalNac 45 mM; hubo también inhibición de la citólisis a concentraciones 45-180 mM de este carbohidrato y de la adhesión de las amibas a GR (88% de inhibición con 45 mM y 16.4% con 4.5 mM). No existió inhibición de la adhesión a células CHO o GR por GlcNac, GlcNac₃, Xil, Glc, Man, NeuNac, Mal o m-Man. También se observó la desaparición de células CHO sin lisis previa, lo que sugirió la fagocitosis de células intactas. Estos autores propusieron que la adhesión amibiana a células CHO y GR, mediada por GalNac, es un mecanismo necesario para la citólisis pero no para la fagocitosis y que existen receptores similares para la adhesión amibiana en las células CHO y los GR. También han sugerido que la actividad de lectina descrita por Kobiler y Mirelman (1980) podría no estar involucrada en la adhesión de amibas enteras a células blanco porque GlcNac₃ 1.5 mM no inhibió la adhesión de los trofozoítos a células CHO ni a GR.

Finalmente, Cano-Mancera (1981) ha encontrado inhibición parcial (23%) de la adhesión de E. histolytica a GR humanos, por GlcNac (50 mM).

Modelo matemático

Recientemente Hernández-Lerma et al. (1982) han postulado un modelo matemático para la adhesión de amibas a eritrocitos.

El modelo se ha desarrollado partiendo de observaciones hechas en el sistema experimental que ellos emplearon, en el cual las amibas y los GR se encuentran en suspensión y dadas las características del propio sistema, las colisiones entre las células son eventos que suceden al azar; es decir, la adhesión amibiana puede ser analizada como una reacción del siguiente tipo:



En la primera etapa, amibas libres (a) interaccionan con eritrocitos libres (e), con una tasa de asociación p, para formar los complejos amiba-eritrocito A_1 , es decir, amibas con un sólo eritrocito adherido. Si la reacción es reversible, los complejos A_1 se separan, con una tasa de disociación q, en la amiba y el eritrocito originales. Análogamente en la segunda etapa los complejos A_1 interaccionan con eritrocitos libres para formar complejos A_2 , es decir, amibas con dos eritrocitos adheridos; existen las respectivas tasas de asociación y disociación, ésta última si se supone también que el proceso es reversible. Se considera que a lo más "n" eritrocitos pueden estar adheridos a una amiba; por lo tanto, la reacción consiste de "n" etapas similares a las dos primeras ya descritas.

De los antecedentes que se acaban de describir sobre la adhesión de trofozoítos de *E. histolytica* a las células animales, se pueden concluir los siguientes hechos más importantes:

1) la mayoría de los estudios microscópicos han revelado el contacto de los trofozoítos con las células epiteliales de la mucosa intestinal y sugerido dos mecanismos para la invasión intestinal por las amibas: el primero sugiere que la invasión se lleva a cabo a través del epitelio interglandular y el segundo sugiere que es a través de las glándulas colónicas; también se ha observado la existencia de microfilopodios en los trofozoítos que establecen un firme contacto con las células blanco.

2) Los estudios de adhesión a monocapas, GR y leucocitos indican que el contacto de los trofozoítos con las células animales precede a la citólisis y ésta a la fagocitosis.

3) La adhesión ha sido analizada con el uso de sistemas experimentales que han variado en los siguientes aspectos: las cepas y células animales usadas, las condiciones de cultivo de las amibas y las células, así como su tratamiento previo a los experimentos; las concentraciones y proporciones de amibas presentes en las mezclas de incubación; los medios de incubación y los sistemas experimentales usados. Como sucede con la adhesión de otros microorganismos patógenos, todas las condiciones usadas pueden modificar la expresión y eficiencia de la adhesión de E. histolytica y los resultados obtenidos en un modelo experimental podrían no observarse o no ser comparables a los observados en otros sistemas.

4) La adhesión amibiana es un evento muy eficiente; depende del tiempo y de la temperatura de incubación, del pH y la fuerza iónica del medio, de la presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) en el medio de incubación y de la concentración y proporción, tanto de amibas como de células blanco en las mezclas de incubación. La adhesión depende de la fase de crecimiento de los cultivos amibianos y se inhibe al fijar a las amibas pero no a las células blanco; no parece depender de los GS mayores ABO de los GR humanos. Además, es un proceso activo que depende del citoesqueleto amibiano, de la producción de energía metabólica de parte de las amibas y de la movilidad de ligandos de la superficie, tanto de las amibas como de los GR.

5) Se han sugerido dos posibles mecanismos para la adhesión de E. histolytica a células animales: uno mediado por GlcNAc y otro por GalNAc; para la adhesión amibiana a bacterias, también se han sugerido dos mecanismos: uno dependiente de Man y otro de GalNAc.

6) El análisis matemático de la adhesión de los trofozoítos de E. histolytica a eritrocitos, propone que se trata de un proceso reversible. Este modelo puede ser empleado para definir más precisamente los eventos cinéticos de la adhesión amibiana.

II. OBJETIVOS

A. Generales

El objetivo general de este trabajo fué continuar con la caracterización de la adhesión de trofozoítos de E. histolytica a glóbulos rojos (GR) humanos (utilizados como células blanco), iniciada en el laboratorio por Cano-Mancera (1981). De esta forma tratar de contribuir:

a) al conocimiento de las cualidades fisicoquímicas y moleculares de la adhesión de los trofozoítos de E. histolytica a células animales y

b) a definir el papel de la adhesión en la virulencia amibiana ya que la adhesión de los trofozoítos a la superficie celular es el evento inicial de la citólisis y fagocitosis y parece ser determinante para la colonización del intestino por las amibas. La adhesión podría ser necesaria, aunque quizá no suficiente para la virulencia amibiana, como tal vez ocurre en los portadores asintomáticos de E. histolytica; por otra parte, la adhesión amibiana parece ser similar a la de otros microorganismos patógenos, esto es, depender de la asociación de adhesinas y receptores celulares, determinados genéticamente tanto en las amibas como en células animales.

Para lograr el objetivo de este proyecto, se dividió al presente trabajo en los objetivos particulares que a continuación se indican.

B. Particulares

1. Determinar la velocidad inicial de adhesión (V_0) de los trofozoítos de E. histolytica a los GR en función de:

- a) la concentración de GR y
- b) la cepa amibiana.

2. Caracterizar la cinética de adhesión de los trofozoítos de E. histolytica a los GR, en condiciones de velocidad submáxima.

3. Explorar si variaba la V_0 de GR a trofozoítos que ya tuvieran 1, 2, 3, ..., n GR adheridos.

4. Explorar el posible efecto inhibitorio específico de carbohidratos sobre la adhesión de los trofozoítos de E. histolytica a GR humanos.

III. MATERIALES

A. Origen de los reactivos

Se obtuvieron de J.T. Baker de México, S.A. (grado reactivo): citrato trisódico dihidratado, cloruro de sodio, fosfato dibásico de potasio, fosfato dibásico de sodio heptahidratado, fosfato monobásico de potasio y fosfato monobásico de sodio monohidratado.

De J.T. Baker Chemical Company (Phillipsburg, New Jersey, E.U.A.), se obtuvieron el glutaraldehido y la azida de sodio. De Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, E.U.A.), se obtuvieron: L-cisteína, β -D-fructosa, α -D-fucosa, D-galactosa, α -D-glucosa, α -lactosa, maltosa monohidratada, D-manosa, α -D-melibiosa, α -metil-D-manosido, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil- β -D-manosamina monohidratada, sacarosa y D-xilosa.

Se adquirió Panmede de Paines and Byrne, Ltd. (Greenford, Inglaterra); peptona de caseína purificada, de Bioxon de México, S.A.; y ácido ascórbico, de Sigma de México, S.A.

El suero de caballo se preparó en el laboratorio a partir de sangre de equinos obtenida en el rastro de Iztapalapa, D.F.

B. Material biológico

Glóbulos rojos (GR)

De humanos adultos, grupos sanguíneos A, B u O (todos Rh⁺).

Cepas de Entamoeba histolytica

HK-9 (Diamond, 1968), HM-1 (Diamond, 1972), HM-2 (De la Torre et al., 1974), HM-3 (De la Torre et al., 1974) y HM-38 (M. De la Torre, comunicación personal).

C. Preparación del medio de cultivo TPS-1

La composición del medio TPS-1 corresponde a la descrita por Diamond (1968), excepto en la mezcla vitamínica, que no se añadió (López-Revilla y Rodríguez-Báez, 1981).

Medio basal TP

Peptona de caseína purificada 5.0 g; Panmede 10.0 g; D-glucosa 2.5 g; L-cisteína 0.5 g; ácido ascórbico 0.1 g; NaCl 2.5 g; KH_2PO_4 0.3 g; K_2HPO_4 0.5 g.

Se mezclaron y disolvieron los componentes con 100 ml de agua tridestilada caliente (60°C), se añadió agua tridestilada (25°C) hasta un volumen de 450 ml, se ajustó el pH con NaOH 10 N, añadido gota a gota mientras la solución se agitaba magnéticamente; se aforó la mezcla a 500 ml, se depositaron 11 ml de medio en tubos para cultivo (de borosilicato, 16 X 125 mm, con tapón de rosca, Corning) y se esterilizaron 20 min en el autoclave a 15 lb·pulg⁻²; se cerraron bien los tapones y los tubos se almacenaron en la obscuridad y a temperatura ambiente no más de dos semanas.

Preparación y almacenamiento del suero de caballo

El suero (congelado a -20°C en frascos con 400 ml) se sumergió en un baño de agua a 36°C hasta descongelarlo, y luego se calentó por inmersión durante 30 min en un baño de agua a 56°C, con agitaciones periódicas; las botellas se secaron por fuera y se distribuyó el suero en fracciones de 10 ml a frascos estériles de borosilicato con tapón de rosca (Wheaton); se incubaron los recipientes a 36°C

por 5 días para comprobar su esterilidad y después se almacenaron a -20°C con el cuello cubierto con cinta adhesiva.

Medio TPS-1 completo

Se añadieron asépticamente 1 o 2 ml de suero a cada tubo con 11 ml de medio TP (concentración final del suero: 9% o 16%, v/v), se mezclaron bien e inmediatamente después se inocularon los tubos con trofozoítos.

D. Composición y preparación de soluciones

Citrato-fosfato-glucosa (CPD)

Citrato trisódico $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.13 g; glucosa 2 g.

Los componentes se mezclaron y disolvieron con agua bidestilada, se ajustó el pH a 6.9 con HCl 5 N añadido gota a gota, se aforó la solución a 1000 ml y se distribuyó en botellas para dilución de leche (de borosilicato con tapón de rosca, Corning) en muestras de 100 ml. Las botellas se esterilizaron 15 min a $15 \text{ lb} \cdot \text{pulg}^{-2}$; se apretaron bien los tapones y se almacenaron a temperatura ambiente.

NaCl 0.15 M

NaCl 9 g.

Se disolvió el NaCl con 800 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 0.1 N añadido gota a gota y se aforó la solución a 1000 ml. La solución se distribuyó en botellas para dilución de leche (de borosilicato, con tapón de rosca, Corning) en muestras de 100 ml; las botellas se esterilizaron 20 min a $20 \text{ lb} \cdot \text{pulg}^{-2}$; se les apretaron los tapones y se almacenaron a temperatura ambiente.

Solución para fijar glóbulos rojos (Bing et al., 1967)

1. Na_2HPO_4 0.15 M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40.2 g. Se disolvió el Na_2HPO_4 con agua bidestilada, se ajustó el pH a 8.2 y se aforó a 1000 ml.

2. NaCl 0.15 M

3. Glutaraldehído al 25%

Preparación: se mezcló un volumen de la solución de Na_2HPO_4 0.15 M con 9 volúmenes de NaCl 0.15 M y 5 volúmenes de agua bidestilada. A 24 partes de esta solución, se le añadió una parte de glutaraldehído al 25% y se usó dicha mezcla inmediatamente.

Salino amortiguado con fosfatos (PBS)

NaCl 6.5 g; K_2HPO_4 2.8 g; KH_2PO_4 0.4 g.

Los componentes se mezclaron y disolvieron con agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 10 N añadido gota a gota y se aforó la solución a 1000 ml. El PBS se distribuyó en botellas para dilución de leche (de borosilicato, con tapón de rosca, Corning), en fracciones de 100 ml; se esterilizaron las botellas 20 min a $20 \text{ lb} \cdot \text{pulg}^{-2}$; se les apretaron los tapones y se almacenaron a temperatura ambiente.

Azida de sodio al 1%

NaN_3 1 g.

Se disolvió la NaN_3 con agua bidestilada y se aforó a 100 ml. La solución se colocó en una botella para dilución de leche (de borosilicato, con tapón de rosca, Corning) y se almacenó a temperatura ambiente.

IV. METODOS

A. Cultivos amibianos axénicos

El tratamiento del material, la preparación del medio TPS-1, y los métodos de cultivo que se citan aquí, son los que se usan actualmente en el laboratorio (López-Revilla y Rodríguez-Báez, 1981).

Cultivos resiembras y cosechas

Se cultivaron las cepas HK-9 y HM-3 con 1 ml de suero por tubo (concentración final del suero: 9% v/v) y las cepas HM-1, HM-2 y HM-38 con 2 ml de suero por tubo (concentración final del suero: 16% v/v). Los cultivos amibianos se incubaron a 36°C. Antes de cada resiembra se observaron con el microscopio invertido (Olympus, modelo CK) para comprobar el buen estado morfológico y la movilidad de las amibas; se agitaron suavemente, se determinó la concentración amibiana con una cámara de Neubauer y se inoculó un número conocido de amibas en tubos con medio TPS-1 fresco.

Se enfriaron los cultivos en agua-hielo por 5 min, y se cosecharon las amibas mediante centrifugación a 90 μ por 3 min a 25°C (500 rpm, centrífuga Damon/IEC modelo CRU 5000, cabezal No. 269).

Mantenimiento de las cepas

Cada cepa amibiana se mantuvo mediante pases seriados a tres tubos en cada resiembra ("cultivos de referencia"); del mejor tubo (en caso de que los cultivos de referencia tuvieran aspecto diferente) se inocularon trofozoítos a cada uno de tres tubos para mantener

los cultivos. Los tubos de la penúltima resiembra se conservaron hasta comprobar el crecimiento de las amibas y ausencia de contaminación en los cultivos recién sembrados. Los cultivos masivos para obtener suficientes trofozoítos para los experimentos se realizaron también en tubos, a partir de los cultivos de referencia.

B. Obtención y manejo de los glóbulos rojos

Todas las manipulaciones fueron asépticas y el material y las soluciones usadas estériles.

Colección de sangre

Se aplicó un torniquete en un brazo del donador de tipo Rh⁺ y grupo sanguíneo (A, B u O) conocido. Con una jeringa (aguja calibre 20) se obtuvieron 10 ml de sangre por punción venosa. Se quitó la aguja para evitar la hemólisis y se vació la sangre inmediatamente en un tubo cónico Falcon de 50 ml que contenía 20 ml de CPD. Se tapó el tubo y se agitó suavemente la mezcla.

Lavado, obtención y almacenamiento del paquete globular

La mezcla de sangre con solución CPD se centrifugó 20 min a 2000 g (2800 rpm, centrífuga clínica IEC, cabezal No. 215) y se lavaron tres veces los glóbulos rojos por centrifugación bajo las mismas condiciones, cada vez con 45 ml de solución de NaCl 0.15 M; después de cada centrifugación se aspiró y descartó el sobrenadante líquido y el sedimento blanco (leucocitos) depositado sobre la pastilla de glóbulos rojos. Después de la última centrifugación se resuspendió el paquete globular a una concentración de 50% (v/v) con solución de NaCl 0.15 M, para proceder a su fijación inmediata.

Fijación

Los glóbulos rojos empacados al 50% (v/v) con NaCl 0.15 M, se enfriaron a 4°C y se añadieron lentamente a 25-50 volúmenes de la solución para fijar los glóbulos rojos preenfriada a 4°C; la mezcla se mantuvo 30 min en agitación magnética suave y al cabo de éste tiempo se comprobó la buena morfología de los glóbulos con un microscopio de contraste de fases (Zeiss Standard). Los glóbulos rojos fijados se centrifugaron 20 min a 2000 g y temperatura ambiente, y se lavaron por centrifugación cinco veces sucesivas con NaCl 0.15 M y cinco veces más con agua bidestilada. Se resuspendieron a una concentración final de 4×10^8 por ml en NaCl 0.15 M-Na₃N 0.2% y de ésta mezcla se repartieron muestras de 0.5 ml en tubos Eppendorf de 1.5 ml que se almacenaron a 4°C.

C. Adhesión de los trofozoítos a los glóbulos rojos

Procedimiento general

Preparación de los glóbulos rojos. Se emplearon GR humanos fijados, de grupo sanguíneo A, B u O (de un sólo lote cada grupo sanguíneo; almacenados en NaCl 0.15 M-Na₃N 0.2% a 4°C). Los glóbulos rojos se centrifugaron 5 min a 1440 g (2000 rpm, centrífuga Damon/IEC, Modelo CRU 5000, cabezal No. 269) y temperatura ambiente, se aspiró cuidadosamente el sobrenadante y se descartó. El paquete globular se lavó tres veces por centrifugación (condiciones descritas antes) con 5 ml de medio de cultivo TP (concentración final: 40×10^6 GR/ml) y a partir de esta mezcla se prepararon suspensiones en medio TP con la concentración de GR requerida en cada experimento.

Preparación de los trofozoítos. Se obtuvieron amibas en fase logarítmica de las cepas HK-9, HM-1, HM-2, HM-3 y HM-38 cultivadas en medio TPS-1. Los trofozoítos se lavaron por centrifugación con 10 ml de medio TP, 3 min a 90 g (500 rpm, centrífuga Damon/IEC, modelo 5000, cabezal No. 269) y temperatura ambiente; el sobrenadante

se descartó y la pastilla de trofozoítos se resuspendió suave y cuidadosamente con 1 a 5 ml de medio TP (dependiendo del tamaño de la misma pastilla). Se determinó la concentración de la suspensión amibiana con una cámara de Neubauer y se prepararon suspensiones diluídas con medio TP que tuviera la concentración amibiana deseada.

Cinética de adhesión. Las suspensiones de GR y las de amibas se preincubaron separadamente 5 min a temperatura ambiente en tubos Eppendorf de 5 ml. Para iniciar la adhesión se mezcló rápidamente la suspensión de GR con la suspensión de amibas; la mezcla se mantuvo con agitación suave y constante (30 ciclos por min, en un mezclador Lab-Tek Aliquot Mixer) y a tiempos preestablecidos de incubación se tomaron muestras de 0.5 ml que se añadieron inmediatamente a tubos Eppendorf (de 1.5 ml) que contenían 0.050 ml de glutaraldehído al 25%, para su fijación. Los tubos se centrifugaron 6 min a 1440 g (2000 rpm, centrífuga Damon/IEC, modelo CRU 5000, cabezal No. 269) y se eliminó el sobrenadante por aspiración. El sedimento se suspendió con 0.025 ml de PBS, se colocaron las células sobre un portaobjetos, se cubrieron y se determinó microscópicamente (contraste de fases, objetivo 40X) la adhesión, como el porcentaje de amibas que tenían glóbulos rojos adheridos en 200 amibas de las muestras de cada tiempo.

D. Cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9 de Entamoeba histolytica a glóbulos rojos humanos (condiciones iniciales)

Estos experimentos fueron similares a los realizados previamente por Cano-Mancera (tesis doctoral, comunicación personal). Bajo el procedimiento general de la cinética de adhesión se prepararon suspensiones de 2.5 ml con 2×10^4 amibas/ml (de la cepa HK-9), y otras del mismo volumen con 2×10^6 GR/ml (grupo sanguíneo O, Rh⁺). Se mezclaron ambas suspensiones, de manera que se obtuvo una mezcla de 5 ml, con 10^4 amibas/ml y 100 GR/amiba. De la mezcla se tomaron muestras a los 0.2, 2, 5, 10, 15, 20, 40 y 60 min de incubación, se fijaron y se determinó el porcentaje de adhesión.

E. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9

La preparación de GR y de amibas se hizo como se describió en el procedimiento general de adhesión. Se utilizaron trofozoítos de la cepa HK-9 en suspensiones de 2.5 ml en medio TP a una concentración de 2×10^4 amibas/ml y GR del grupo sanguíneo O, Rh⁺ en suspensiones de 2.5 ml en medio TP que tenían de 2×10^5 a 2×10^6 GR/ml.

Para iniciar el experimento, se mezclaron cada una de las suspensiones de GR con cada una de las de amibas, de modo que se obtuvieron mezclas con concentraciones finales de 10^4 amibas/ml y 1, 2, 4, 6, 8 y 10×10^5 GR/ml; las relaciones GR/amiba fueron: 10, 20, 40, 60, 80 y 100 respectivamente. Las mezclas se mantuvieron en agitación suave y constante, se tomaron muestras a los 0.2, 2 y 5 min de incubación y se fijaron inmediatamente con glutaraldehído. Después de 2 h de fijación, las muestras se manejaron como se describió en el procedimiento general y en ellas se determinó microscópicamente la adhesión.

Se calculó la velocidad inicial de adhesión (V_0) con la ecuación:

$$V_0 = (\text{Adhesión}_{2 \text{ min}} - \text{Adhesión}_{0.2 \text{ min}}) / 1.8 \text{ min.}$$

En experimentos posteriores para estudiar el efecto de concentraciones más bajas de GR, se emplearon las siguientes concentraciones finales en las mezclas de incubación: 1, 2, 5, 10 y 20×10^4 GR/ml; la concentración final de trofozoítos se mantuvo constante, esto es, 10^4 amibas/ml. La relación GR/amiba fué entonces: 1, 2, 5, 10 y 20 respectivamente. Se tomaron muestras únicamente a los 5 y 10 min de incubación.

Se calculó la velocidad inicial de adhesión (V_0) con la ecuación:

$$V_0 = (\text{Adhesión}_{10 \text{ min}} - \text{Adhesión}_{5 \text{ min}}) / 5 \text{ min.}$$

F. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos de cinco cepas de Entamoeba histolytica

Se prepararon suspensiones amibianas de las cepas: HK-9, HM-1, HM-2, HM-3 y HM-38 en medio TP; y otras de GR grupo sanguíneo O, también en medio TP, de la forma como se describió en el procedimiento general. Para la mezcla de incubación se emplearon 1 ml de cada una de las suspensiones amibianas con 2×10^4 amibas y volúmenes iguales de suspensiones de GR con concentraciones finales que variaron desde 10^4 hasta 6×10^5 por ml. Cada ml de suspensión de GR se mezcló con cada ml de suspensión amibiana, de manera que se obtuvieron mezclas con concentraciones celulares finales de 10^4 amibas/ml y las siguientes relaciones GR/amiba: 1, 5, 20, 40 y 60. Las mezclas se mantuvieron en incubación a temperatura ambiente y con agitación suave durante 5 min. Se tomaron muestras que se fijaron con glutaraldehído y en ellas se determinó microscópicamente la adhesión.

Se calculó la velocidad inicial de adhesión (V_0) con la ecuación:

$$V_0 = \text{Adhesión}_{5 \text{ min}} / 5 \text{ min.}$$

Los resultados se ajustaron con el método de regresión lineal, y las pendientes (constante de velocidad "A") de la ecuación obtenida para cada cepa se compararon estadísticamente con la prueba t de Student de dos colas y $(n-1)$ grados de libertad, en donde $n = \text{No. de pares.}$

G. Cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9 bajo condiciones de velocidad submáxima

Se realizaron cinéticas de adhesión con suspensiones de trofozoítos de la cepa HK-9 y GR grupo sanguíneo O, con concentraciones finales de 10^4 amibas/ml y 1, 2 o 5×10^4 GR/ml. Se tomaron muestras a los 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 min de incubación, y se determinó en ellas la proporción de complejos amiba-GR, mediante observación microscópica.

H. Cinética de adhesión de trofozoítos de cinco cepas a GR humanos de los grupos sanguíneos mayores ABO, bajo condiciones de velocidad submáxima

Se efectuaron cinéticas de adhesión con trofozoítos de las cepas HK-9, HM-1, HM-2, HM-3 y HM-38; y eritrocitos de los grupos sanguíneos (GS) A, B u O.

Bajo el procedimiento general de adhesión se prepararon suspensiones con 2×10^4 amibas/ml. Se mezclaron 2.5 ml de cada una de las suspensiones de GR de los diferentes GS, con 2.5 ml de cada una de las suspensiones de trofozoítos. La incubación se realizó durante 40 min; se tomaron muestras cada 5 min durante la primera media hora y una última al término de la incubación. Las muestras se fijaron y se determinó en ellas el porcentaje de adhesión.

Para observar la influencia de la cepa amibiana sobre la cinética de adhesión, se promediaron los porcentajes de adhesión obtenidos en las cinéticas hechas con eritrocitos de los tres GS mayores ABO.

Se realizó regresión lineal con la adhesión obtenida a los 5, 10 y 15 min de incubación. Las pendientes (velocidad inicial de adhesión " V_0 ") de la ecuación obtenida para cada cepa se compararon estadísticamente con la prueba t de Student de dos colas y $(n-1)$ grados de libertad, en donde n = No. de pares.

I. Cuantificación del porcentaje de amibas con uno o más eritrocitos adheridos en las cinéticas de adhesión

Se determinaron los porcentajes de amibas con uno o más GR adheridos, a partir de las cinéticas de adhesión hechas con trofozoítos de las cepas HK-9, HM-1, HM-2, HM-3 y HM-38; y GR de los GS mayores ABO. Se promediaron los porcentajes de adhesión obtenidos con los eritrocitos de los tres GS, para cada población amibiana.

J. Efecto de carbohidratos sobre la adhesión de los trofozoítos

Se emplearon trofozoítos de las cepas: HK-9, HM-1, HM-2, HM-3 y HM-38; y eritrocitos de los GS mayores ABO. Se prepararon suspensiones con 10^5 GR/ml y 2×10^4 amibas/ml en medio TP sin carbohidratos (control) o uno de los siguientes carbohidratos (50 mM): Xil, Fuc, Fru, Gal, Glc, Man, m-Man, Lac, Mel, Mal, Sac, GalNac, GlcNac o ManNac. Se preincubó a las suspensiones celulares por 5 min a temperatura ambiente. Para iniciar la adhesión se mezcló rápidamente 1 ml de la suspensión de GR con 1 ml de suspensión de amibas y se obtuvieron mezclas con 10^4 amibas/ml y 5 GR/amiba, que se mantuvieron a temperatura ambiente con agitación suave durante 10 min. Se tomaron muestras que se fijaron con glutaraldehído y en ellas se determinó microscópicamente el porcentaje de adhesión.

K. Efecto de la concentración de cuatro carbohidratos inhibitorios sobre la adhesión amibiana

Se utilizaron suspensiones amibianas de 1 ml con 2×10^4 amibas de las cepas HK-9, HM-1, HM-2, HM-3 y HM-38; y suspensiones de GR del mismo volumen con 10^5 eritrocitos. Las suspensiones se hicieron en medio TP solo (control) y en soluciones de los carbohidratos GalNac, Gal, ManNac y GlcNac (disueltos en medio TP) cuyas concentraciones finales en las mezclas variaron desde 5×10^{-2} M hasta 10^{-10} M. Las mezclas se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y con agitación suave. En las muestras fijadas se determinó el porcentaje de adhesión.

V. RESULTADOS

A. Cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9 de Entamoeba histolytica a glóbulos rojos humanos (condiciones iniciales)

La primera serie de experimentos tuvo como finalidad, reproducir la cinética de adhesión amibiana a glóbulos rojos humanos obtenida anteriormente en el laboratorio por Cano-Mancera (tesis doctoral, comunicación personal); en la que se observó que la adhesión aumentó rápidamente durante los primeros 5 min, después se incrementó en forma asintótica en función del tiempo de incubación y cuya velocidad inicial era de 12 %/min.

El modelo experimental inicial consistió en: 1) mezclar 2.5 ml de una suspensión de 5×10^6 GR con un volumen igual de una suspensión de 5×10^4 amibas, para obtener una concentración de 10^4 amibas/ml y una relación de 100 GR por amiba; 2) incubar la mezcla con agitación suave y constante; 3) tomar a tiempos predeterminados muestras que se fijaron inmediatamente con glutaraldehído y 4) determinar mediante observación al microscopio los porcentajes de adhesión (i.e., la proporción de los complejos amiba-GR) en función del tiempo (Fig. 1).

Los resultados obtenidos en estos experimentos fueron similares a los de Cano-Mancera, es decir, la adhesión aumentó en función del tiempo de incubación -hubo 40% de complejos amiba-GR en los primeros 5 min y 90% a los 60 min de incubación (Fig. 2)- y las velocidades de adhesión fueron 7 %/min en el intervalo de 0.2 a 2 min, 8.7 %/min en el intervalo de 2 a 5 min y 3.9 %/min en el intervalo 5 a 10 min (calculadas a partir de los porcentajes de adhesión de la Fig. 2, con la ecuación: $V = (\text{Adhesión } t_2 - \text{Adhesión } t_1) / (t_2 - t_1)$; en donde V es la velocidad de adhesión, la adhesión se expresa porcentualmente y el tiempo en min).

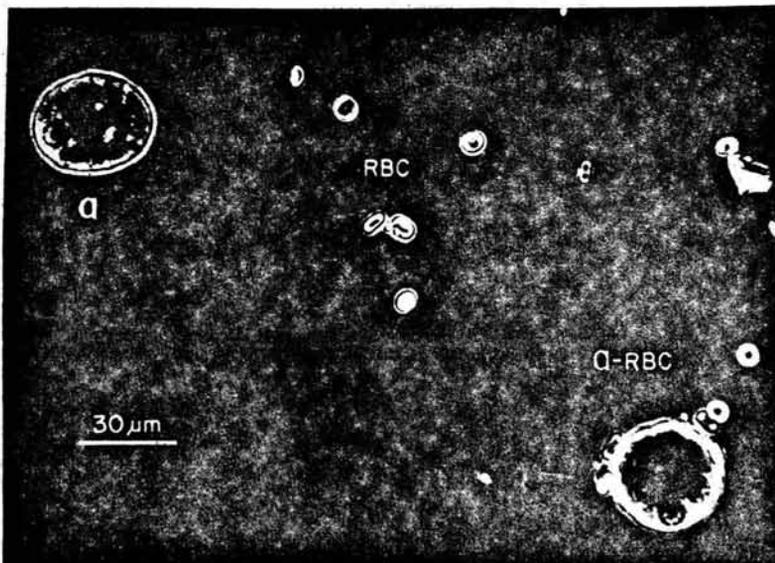
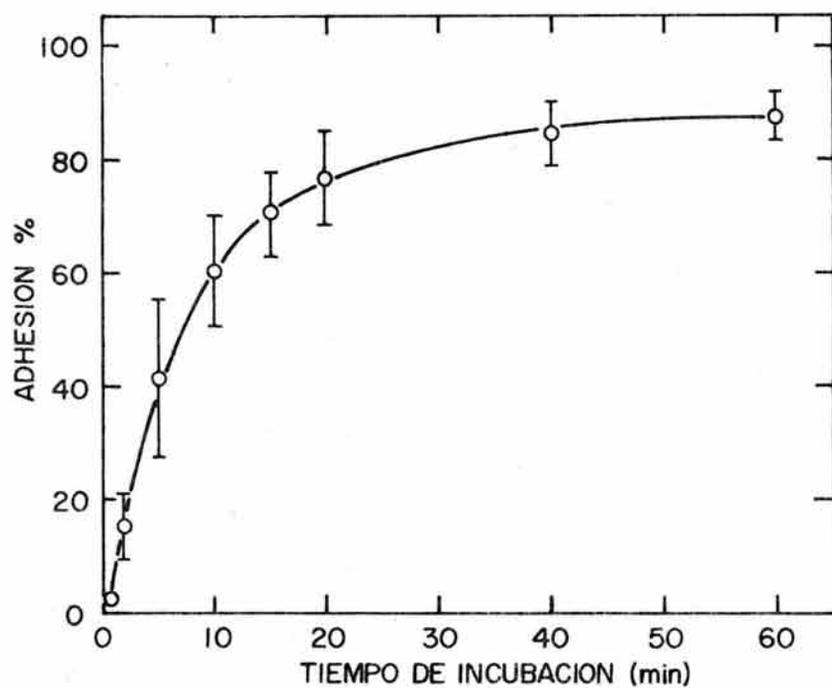


FIGURA 1. Aspecto microscópico de los glóbulos rojos adheridos a los trofozoítos de E. histolytica. Se distinguen claramente amibas libres (a), eritrocitos libres (RBC) y complejos amiba-eritrocito (a-RBC). Contraste de fases, (Cortesía de López-Revilla y Cano-Mancera).

FIGURA 2. Cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9 de Entamoeba histolytica a glóbulos rojos humanos (condiciones iniciales). Se mezclaron volúmenes iguales de una suspensión amibiana con otras de glóbulos rojos (GR); las concentraciones finales en las mezclas fueron 10^4 amibas/ml y 10^6 GR/ml. Las mezclas se incubaron a 25°C con agitación suave. Se tomaron muestras a los tiempos indicados y se fijaron con glutaraldehído. Cada símbolo representa el promedio y la desviación estándar de los porcentajes de adhesión obtenidos en cuatro experimentos independientes.



Por lo tanto, se concluyó que la cinética de adhesión sí era reproducible, aunque la velocidad inicial de adhesión (V_0) encontrada bajo las condiciones de este sistema experimental era muy alta para poder cuantificarla en forma precisa. Por tal motivo, con el objeto de obtener condiciones adecuadas para la determinación precisa de la V_0 , es decir, condiciones con las que la V_0 fuese menor, se decidió disminuir la concentración de GR en las mezclas de incubación.

B. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9

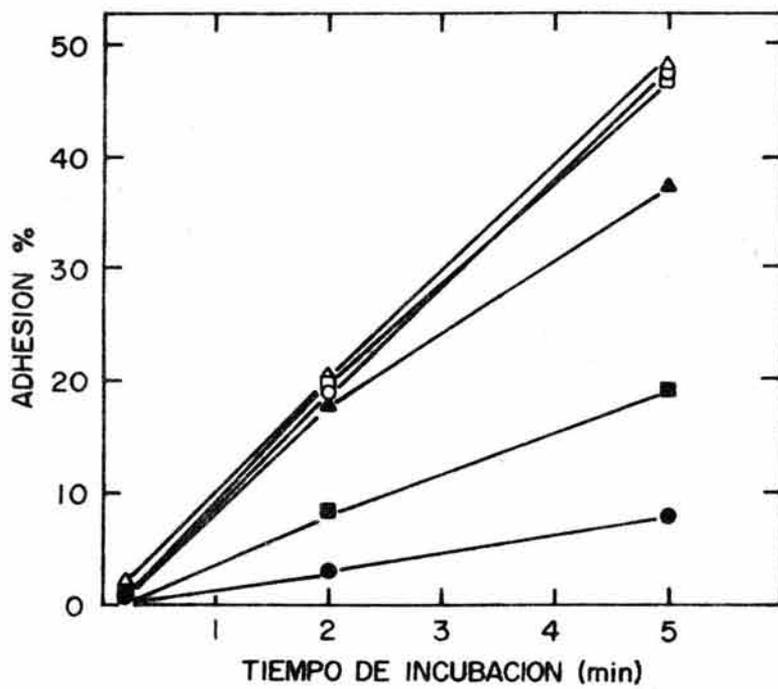
1) 10^5 a 10^6 por ml

Para analizar el efecto de una menor concentración de GR sobre la V_0 , se hicieron experimentos a tiempos cortos (0.2, 2 y 5 min) con trofozoítos de la cepa HK-9 y eritrocitos del grupo sanguíneo O. La concentración amibiana en las mezclas de incubación se mantuvo constante (10^4 amibas/ml), mientras que la de los GR se varió desde 10^5 hasta 10^6 por ml.

Se encontró que la adhesión aumentó proporcionalmente con la concentración de eritrocitos. Fué similar con 4×10^5 hasta 10^6 GR por ml a los 2 min, y con 6×10^5 hasta 10^6 GR por ml a los 5 min de incubación; desde los 2 min hubo seis veces mayor adhesión con 6×10^5 que con 10^5 GR por ml; con 10^5 y 2×10^5 GR por ml, no hubo adhesión detectable a los 0.2 min (Fig. 3). Con 6×10^5 hasta 10^6 GR por ml, la proporción de complejos amiba-GR fué similar a la encontrada anteriormente por Cano-Mancera (40 a 48 %) con 10^6 GR/ml (comunicación personal), mientras que con 10^5 GR/ml fué de solamente 8%.

Las evidencias anteriores indicaron que la V_0 sí dependía de la concentración de GR y empezaba a disminuir con concentraciones menores de 6×10^5 GR/ml. Al calcular las velocidades de adhesión para los intervalos de 0.2 a 2 min y de 2 a 5 min de incubación,

FIGURA 3. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9. Se usó una concentración fija de amibas (10^4 /ml) y las siguientes concentraciones de GR (por ml): 10^5 (●), 2×10^5 (■), 4×10^5 (▲), 6×10^5 (○), 8×10^5 (□) y 10^6 (△). Incubación como en la Fig.2.



se observó que éstas aumentaron en forma directamente proporcional con la concentración de GR cuando ésta estuvo entre 10^5 y 4×10^5 por ml e inclusive hasta 6×10^5 GR/ml, al considerar el intervalo de 2 a 5 min (Fig. 4). Mediante análisis de regresión lineal de la velocidad de adhesión obtenida en dichos intervalos de concentración eritrocítica, se obtuvieron las siguientes ecuaciones de velocidad:

$$V_{0.2 \text{ a } 2 \text{ min}} = 2.51 \times 10^{-5} \text{ (GR/ml)} - 0.60, \text{ (r}^2 = 0.99) \text{ y}$$

$$V_{2 \text{ a } 5 \text{ min}} = 1.52 \times 10^{-5} \text{ (GR/ml)} + 0.27, \text{ (r}^2 = 0.99).$$

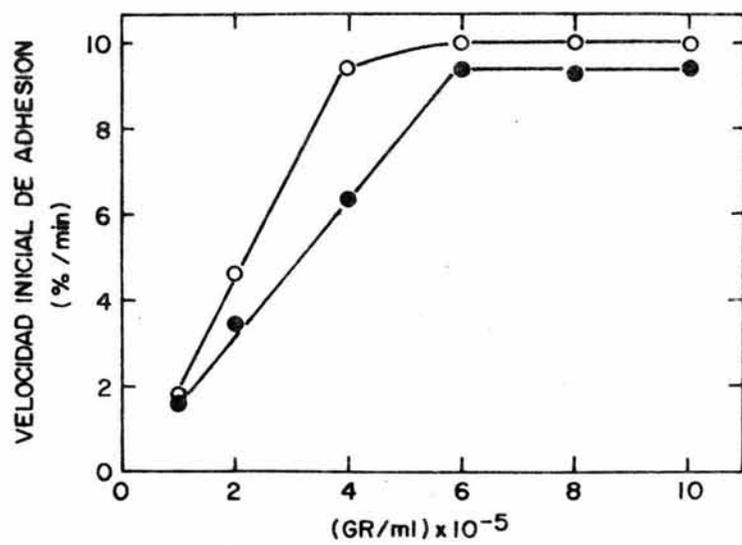
Por lo tanto, la velocidad calculada en el intervalo más corto de tiempo (0.2 a 2 min) fué 1.7 veces mayor que la velocidad en el intervalo mayor (2 a 5 min). Sin embargo, con concentraciones mayores de GR, ambas V_0 tuvieron valores similares, máximos (9.5 %/min) y constantes (Fig. 4).

Estos hallazgos fueron de gran trascendencia para el trabajo subsecuente, ya que indicaban que bajo las condiciones experimentales previas a este trabajo, la V_0 había sido "máxima" e implicaban que con concentraciones de GR menores de 6×10^5 por ml, se tendrían condiciones de velocidad de adhesión "submáxima" que permitirían, por una parte, medir con mayor precisión la V_0 , y por la otra, explotar estas nuevas condiciones del sistema en la caracterización ulterior de la adhesión amibiana y sobre todo del efecto de sus inhibidores, a los que debería ser mucho más sensible.

2) 10^4 a 6×10^5 GR por ml

Para afinar estos resultados y asegurar que en adelante se trabajaría en las condiciones más convenientes de velocidad submáxima, se probaron concentraciones aún menores de GR. Se hizo un experimento en el que la concentración final de GR varió desde 10^4 hasta 6×10^5 por ml. La mezcla de adhesión se incubó únicamente por 5 min debido a que: 1) en tiempos menores de 2 min y con concentraciones menores de 2×10^5 GR/ml, la adhesión fué mínima (ver Fig. 2) y 2) el medir la adhesión a tiempos mayores de 5 min no garantizaba la exactitud requerida de la velocidad inicial.

FIGURA 4. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9. La velocidad inicial de adhesión se calculó con los resultados de la Fig.3 y la ecuación $V = (\text{Adhesión } t_2 - \text{Adhesión } t_1) / (t_2 - t_1)$, en donde V es la velocidad de adhesión calculada con los datos de la adhesión encontrada a los tiempos t_1 y t_2 después de haber efectuado las mezclas de adhesión. Velocidades calculadas para los períodos de 0.2 min a 2 min (○) y de 2 min a 5 min (●).



Bajo estas condiciones se encontró que la V_0 aumentó proporcionalmente con la concentración de GR durante todo el intervalo de concentraciones probadas. Este hallazgo resultó interesante para el análisis de la adhesión amibiana, porque indicaba que la cinética de adhesión podría analizarse a velocidad submáxima en un intervalo lineal bastante amplio de concentraciones de GR, y bajo tales condiciones podría caracterizarse mejor.

Por lo tanto, con estos experimentos se pudo concluir que finalmente se contaba con las condiciones que definían un sistema sensible y preciso para la medición de la V_0 . Estas condiciones eran: 1) 10^4 amibas/ml, 2) 10^4 a 6×10^5 GR por ml y 3) un período de incubación de 5 min.

La velocidad determinada a los 5 min de incubación, se utilizó subsecuentemente como el valor mínimo conveniente para calcular la V_0 , porque a tiempos más cortos la V_0 era mínima y a tiempos más largos no se garantizaba su cuantificación apropiada. La V_0 obtenida con las condiciones iniciales de incubación para la cepa HK-9 (9.5 %/min; ver Fig. 4), disminuyó 31.7 veces (0.3 %/min), cuando se utilizó 1 GR/amiba.

Las nuevas condiciones que hicieron al sistema más sensibles, se utilizaron inmediatamente para comparar la V_0 de diferentes cepas amibianas.

C. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos de cinco cepas de Entamoeba histolytica

Para conocer la V_0 de diferentes cepas de E. histolytica, se incubaron mezclas que contenían 10^4 amibas (cepas HK-9, HM-1, HM-2, HM-3 y HM-38) y $1-60 \times 10^4$ GR por ml a temperatura ambiente; a los 5 min se fijaron muestras con glutaraldehído y se determinó en ellas la proporción de complejos amiba-GR. Se calculó la V_0 con la ecuación: $V_0 = \text{Adhesión}_{5 \text{ min}} / 5 \text{ min}$.

La adhesión en todos los casos aumentó en forma directamente proporcional a la concentración de GR y se distinguieron claramente dos grupos: el de las cepas HK-9 y HM-3 con V_0 más altas y el de las cepas HM-1, HM-2 y HM-38 con V_0 menores (Fig. 5). Mediante regresión por mínimos cuadrados de los experimentos respectivos, se obtuvieron las ecuaciones que describen la V_0 de cada cepa en función de la concentración de GR (Tabla 3).

Con estos resultados se vió que las V_0 de los trofozoítos de las cepas HK-9 y HM-3 fueron más altas y similares entre ellas y en promedio 2.3, 4.3 y 7.5 veces mayores que las de los trofozoítos de las cepas HM-1, HM-2 y HM-38 respectivamente.

Las constantes de velocidad ("A") obtenidas con las ecuaciones de cada cepa se compararon estadísticamente para ver si eran significativamente ($p \leq 0.05$) similares o diferentes entre sí. Los resultados (Tabla 4) no mostraron diferencias significativas entre las constantes de velocidad de los trofozoítos de las cepas HK-9 y HM-3 ($p = 0.19$), pero indicaron que los parámetros respectivos de ambas sí eran significativamente diferentes a los de los trofozoítos de las cepas HM-1, HM-2 y HM-38 ($p < 0.05$); por último, el análisis estadístico probó que las constantes de velocidad de los trofozoítos de las tres últimas cepas también eran significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$).

De estos experimentos se concluyó que la V_0 : 1) es directamente proporcional a la concentración de GR en el intervalo de 10^4 a 6×10^5 por ml, 2) es semejante y máxima para trofozoítos de las cepas HK-9 y HM-3, y menor para las cepas HM-1, HM-2 y HM-38, 3) es un parámetro específico de cepa y, por lo tanto, 4) constituye un criterio adecuado para comparar la adhesión de diversas cepas amibianas.

Una vez concluida esta fase experimental se exploró la cinética de adhesión amibiana por tiempos más largos bajo las nuevas condiciones experimentales que aseguraban velocidad submáxima y linealidad en función del tiempo de incubación.

FIGURA 5. Efecto de la concentración de glóbulos rojos sobre la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos de cinco cepas de Entamoeba histolytica. La concentración amibiana en las mezclas de incubación se mantuvo fija (10^4 amibas/ml). Se tomaron muestras a los 5 min de incubación y se calculó la velocidad inicial de adhesión con la ecuación $V_0 = \text{Adhesión}_{5 \text{ min}} / 5 \text{ min}$. Los símbolos representan el promedio de la velocidad inicial de adhesión calculada en experimentos hechos por triplicado con trofozoítos de las cepas HK-9 (○), HM-1 (●), HM-2 (□), HM-3 (△) y HM-38 (■).

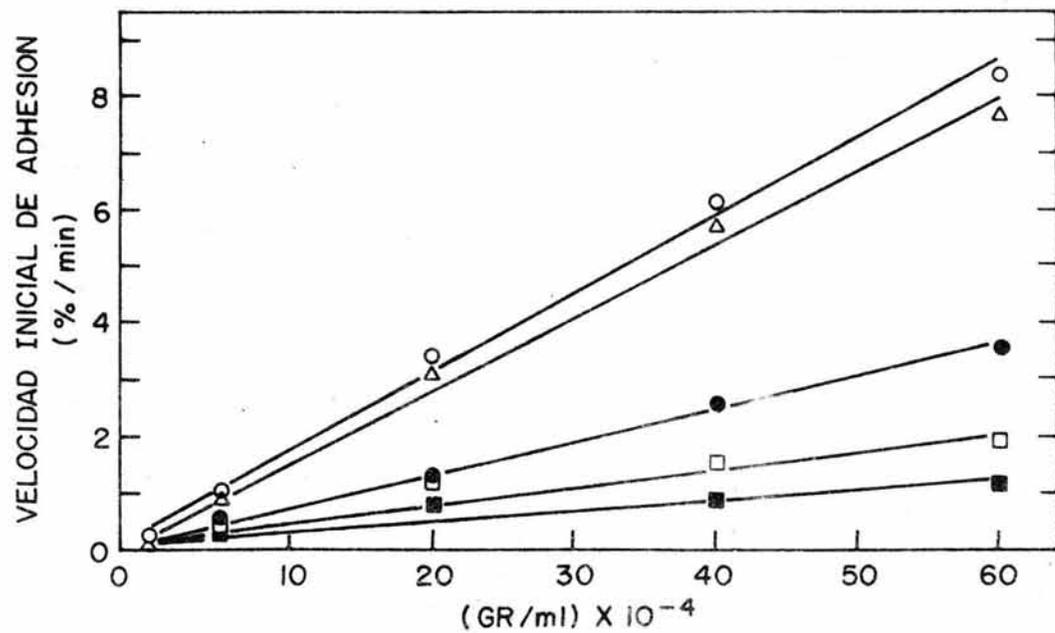


TABLA 3. Ecuaciones de la velocidad inicial de adhesión de cinco cepas de E. histolytica

Cepa	Ecuación ^a	Coefficiente de correlación (r ²)
HK-9	$14.0 \times 10^{-6} \text{ (GR/ml) + 0.33}$	0.99
HM-1	$5.8 \times 10^{-6} \text{ (GR/ml) + 0.18}$	0.99
HM-2	$3.1 \times 10^{-6} \text{ (GR/ml) + 0.17}$	0.93
HM-3	$12.8 \times 10^{-6} \text{ (GR/ml) + 0.25}$	0.99
HM-38	$1.8 \times 10^{-6} \text{ (GR/ml) + 0.22}$	0.90

^aCalculada a partir de los experimentos de la Fig. 5

V_0 (%/min) = A (GR/ml) + b; en donde V_0 = velocidad inicial de adhesión; A = constante de velocidad; b = ordenada al origen obtenida por extrapolación.

TABLA 4. Comparación de las constantes de velocidad de la adhesión (A) de trofozoítos de E. histolytica a GR humanos

Grupos comparativos de cepas	A X 10 ⁻⁶ ^a	A	
		relativa	P ^b
HK-9	14.0 ± 0.8	1.00	--
HM-1	5.8 ± 0.7	0.41	<0.02
HM-2	3.1 ± 0.5	0.22	<0.005
HM-3	12.8 ± 0.6	0.91	0.19
HM-38	1.8 ± 0.4	0.13	<0.005
HM-1	5.8 ± 0.7	1.00	--
HM-2	3.1 ± 0.5	0.53	<0.005
HM-3	12.8 ± 0.6	2.21	<0.01
HM-38	1.8 ± 0.4	0.31	<0.02
HM-2	3.1 ± 0.5	1.00	--
HM-3	12.8 ± 0.6	4.13	<0.005
HM-38	1.8 ± 0.4	0.58	<0.05
HM-3	12.8 ± 0.6	1.00	--
HM-38	1.8 ± 0.4	0.14	<0.005

^aDatos de la Tabla 3

^bObtenida con la prueba de t de Student de dos colas y (n-1) grados de libertad.

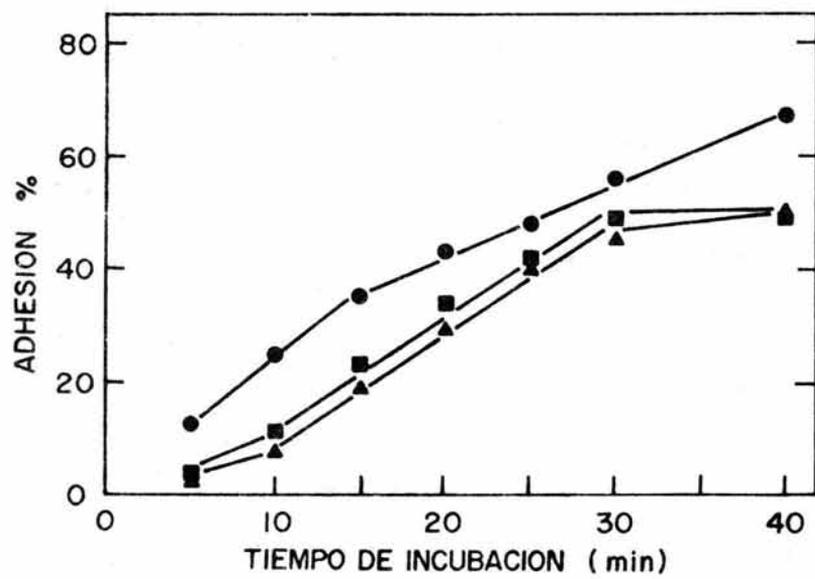
D. Cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9 bajo condiciones de velocidad submáxima

Para definir las condiciones bajo las cuales las curvas de la cinética de adhesión con velocidad submáxima fueran lineales, se hicieron experimentos con 10^4 amibas/ml de la cepa HK-9 (una de las dos más rápidas) y 10^4 , 2×10^4 y 5×10^4 GR por ml, porque con ellas se obtuvo anteriormente la V_0 más baja (ver Fig. 5). La incubación se llevó a cabo durante 40 min; se tomaron muestras cada 5 min durante los primeros 30 min y una última muestra al término de la incubación.

Los resultados se muestran en la Fig. 6. Las cinéticas hechas con 10^4 y 2×10^4 GR por ml fueron similares; en ellas, la adhesión durante los primeros 10 min de incubación fué menor del 10%; de los 10 a los 30 min la cinética de adhesión fué lineal y llegó al 45%; a los 40 min ya no hubo incremento de la adhesión. En cambio, con 5×10^4 GR/ml la cinética fué lineal y más rápida durante los primeros 15 min de incubación; en los tiempos posteriores la adhesión aumentó también linealmente y llegó al 67% a los 40 min.

Se concluyó que 5×10^4 GR/ml era la concentración más apropiada para realizar el estudio comparativo de las cinéticas de adhesión de las cinco cepas, porque a esa concentración la V_0 fué constante (ver Fig. 5), lo que se manifestó por la linealidad de la curva y porque hubo mayor adhesión en un intervalo más amplio de tiempo (15 min) que en las cinéticas hechas con 10^4 y 2×10^4 GR por ml; lo que hacía suponer que con cepas más lentas que HK-9 también se podría cuantificar la adhesión.

FIGURA 6. Cinética de adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9 bajo condiciones de velocidad submáxima. Se usó una concentración fija de amibas (10^4 por ml) y las siguientes concentraciones finales de GR (por ml): 10^4 (▲), 2×10^4 (■) o 5×10^4 (●). Los símbolos representan el promedio de adhesión de dos experimentos.



E. Cinética de adhesión de trofozoítos de cinco cepas amebianas a GR humanos de los grupos sanguíneos mayores ABO, bajo condiciones de velocidad submáxima

Con el propósito de comparar la cinética de adhesión de diferentes cepas de E. histolytica, y obtener ecuaciones particulares con las que se determinaran parámetros de adhesión con la mayor precisión; se incubaron mezclas que contenían 10^4 amibas/ml, de las cepas: HK-9, HM-1, HM-2, HM-3 o HM-38; y 5×10^4 GR/ml de los GS mayores A, B u O.

No hubo diferencias notables en la adhesión de los trofozoítos a los eritrocitos de los tres GS utilizados, excepto para las cepas HK-9 y HM-3, donde las curvas de adhesión a GR "O" se separaron claramente de las curvas de los GR "A" y "B" a partir de los 10 min de incubación (Fig. 7).

Estos resultados sugieren que: 1) la adhesión de trofozoítos de las cepas HM-1, HM-2 y HM-38 parece estar mediada por componentes comunes en los GR, que son diferentes a los determinantes de los GS mayores ABO y 2) la adhesión de trofozoítos de las cepas HK-9 y HM-3 pudiese ser similar a la de las primeras cepas (particularmente para el GS O), y estar mediada también por los determinantes antigénicos de los GS A (GalNAc) y B (Gal; ver Tabla 2).

Para contar con una curva específica y representativa de la cinética de adhesión de cada cepa amebiana a los GR, se promediaron los porcentajes de adhesión obtenidos en cada tiempo con los tres GS para cada cepa (Fig. 8).

En todos los casos la adhesión durante los primeros 15 min fué proporcional al tiempo de incubación y más rápida que a tiempos posteriores. A los 5 min de incubación la adhesión promedio fué de 13.5% y 10.2% para las cepas HK-9 y HM-3 respectivamente, mientras que la adhesión promedio para los trofozoítos de las cepas HM-1, HM-2 y HM-38 fué 3.2%, 2.8% y 2.1% respectivamente. La adhesión promedio de los trofozoítos de las cepas HK-9 y HM-3 a los 15 min de incubación permaneció superior (30.5% y 27.3% respectivamente) a la de HM-1 (10.9%), HM-2 (10.6%) y HM-38 (10%).

FIGURA 7. Influencia del grupo sanguíneo mayor de los GR sobre la adhesión a trofozoítos de cinco cepas amibianas, bajo condiciones de velocidad submáxima. Se incubaron mezclas con 10^4 amibas/ml y 5 GR/amiba de cada uno de los GS mayores O (○), A (□) o B (△). A los tiempos indicados se fijaron muestras con glutaraldehído y en ellas se determinó la adhesión. Los símbolos representan el promedio de la adhesión de tres experimentos.

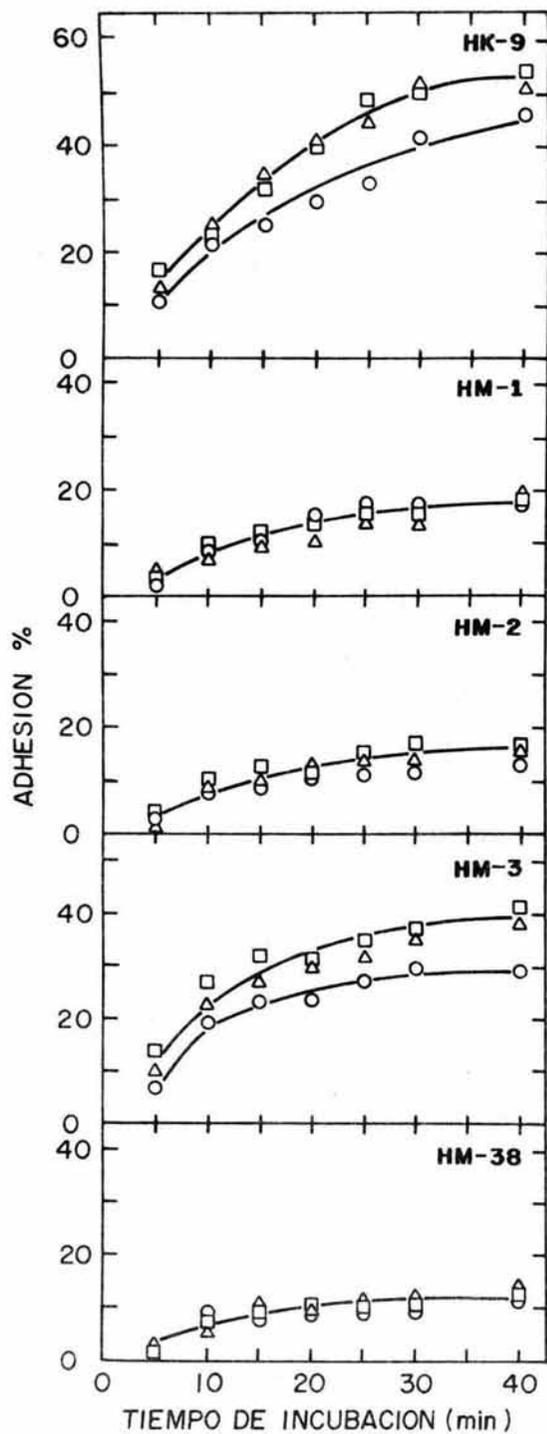
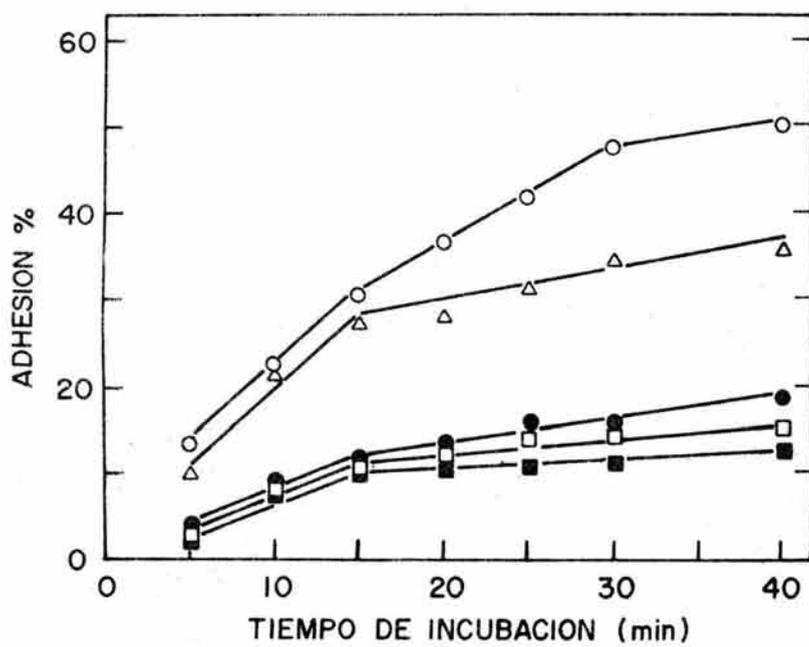


FIGURA 8. Cinética de adhesión de trofozoítos de cinco cepas bajo condiciones de velocidad submáxima. Se promediaron los porcentajes de adhesión encontrados en los nueve experimentos hechos con los tres GS para cada cepa (descritos en la Fig. 7). Cinéticas de trofozoítos de las cepas HK-9 (○), HM-1 (●), HM-2 (□), HM-3 (△) y HM-38 (■).



Por regresión con mínimos cuadrados, se obtuvieron las ecuaciones particulares que describen la cinética de adhesión promedio de cada cepa durante los primeros 15 min de incubación con 5×10^4 GR/ml y 10^4 amibas/ml (Tabla 5).

Las velocidades iniciales promedio obtenidas con las ecuaciones se compararon estadísticamente (Tabla 6). Las cepas HK-9 y HM-3 no fueron significativamente diferentes entre sí ($p = 0.96$), pero sí difirieron de las cepas HM-1, HM-2 y HM-38, que a su vez fueron similares entre ellas.

Con estos resultados se observó que había perfecta correlación entre la V_0 (ver Fig. 5) y la cinética de adhesión (ver Fig. 8); es decir, los trofozoítos de las cepas HK-9 y HM-3 que tuvieron la mayor V_0 correspondieron a los mayores porcentajes de adhesión, mientras que las cinéticas de las cepas HM-1, HM-2 y HM-38 cuyas V_0 fueron menores, permanecieron igualmente bajas.

Las conclusiones de esta serie de experimentos sobre la cinética de adhesión de diferentes cepas amibianas fueron: 1) la V_0 de la cinética de adhesión es directamente proporcional al tiempo de incubación (15 min), con 5 GR/amiba y 10^4 amibas/ml; 2) existe correlación entre V_0 y la cinética de adhesión de cada cepa amibiana y ambas permiten establecer dos grupos de cepas amibianas: el primero, con las velocidades de adhesión más altas, formado por las cepas HK-9 y HM-3; y el segundo constituido por las cepas HM-1, HM-2 y HM-38 con menores V_0 ; y 3) se confirmó el hallazgo previo de que la V_0 es un parámetro específico que permite distinguir entre diferentes cepas amibianas.

Con esta parte del trabajo se terminaron de definir las condiciones que hicieron a los ensayos de adhesión más sensibles y precisos de manera que pudieran explorarse y cuantificarse mejor aspectos tales como: la adhesión sucesiva de GR a complejos amiba-GR y el efecto de inhibidores específicos de la adhesión amibiana.

TABLA 5. Ecuaciones de la adhesión
ambiana en condiciones de
velocidad submáxima

Cepa	Ecuación ^a	Coefficiente de correlación (r ²)
HK-9	1.69 (t) + 5.5	0.95
HM-1	0.77 (t) + 0.004	0.92
HM-2	0.75 (t) - 0.3	0.90
HM-3	1.71 (t) + 3.1	0.91
HM-38	0.44 (t) - 0.3	0.90

^aCalculada a partir de los experimentos
de la Fig. 8.

Adhesión(%) = V_0 (t) + b; en donde V_0 =
velocidad inicial de adhesión; t =
tiempo de incubación (en min); b =
ordenada al origen obtenida por
extrapolación.

TABLA 6. Comparación de las velocidades iniciales de adhesión a GR humanos de trofozoítos de E. histolytica

Grupos comparativos de cepas	Velocidad inicial de adhesión		P ^b
	Absoluta ^a	Relativa	
HK-9	1.69 ± 0.5	1.00	--
HM-1	0.77 ± 0.2	0.46	<0.05
HM-2	0.75 ± 0.2	0.44	<0.05
HM-3	1.71 ± 0.3	1.01	0.96
HM-38	0.74 ± 0.2	0.44	<0.02
HM-1	0.77 ± 0.2	1.00	--
HM-2	0.75 ± 0.2	0.97	0.53
HM-3	1.71 ± 0.3	2.22	<0.01
HM-38	0.74 ± 0.2	0.96	0.77
HM-2	0.75 ± 0.2	1.00	--
HM-3	1.71 ± 0.3	2.28	<0.02
HM-38	0.74 ± 0.2	0.96	0.93
HM-3	1.71 ± 0.3	1.00	--
HM-38	0.74 ± 0.2	0.43	<0.01

^aDatos de la Tabla 5.

^bObtenidos con la prueba de t de Student de dos colas y (n-1) grados de libertad.

F. Cinética de formación de complejos de adhesión específicos

El modelo matemático de la adhesión de amibas a eritrocitos desarrollado por Hernández-Lerma *et al.* (1982), postula la existencia de etapas discretas en la formación de complejos de adhesión en las que las amibas se unen sucesivamente a uno, dos, tres, ..., n GR cuyas tasas de asociación y disociación son constantes.

Para tratar de averiguar experimentalmente si esta suposición era cierta, se trató de analizar si la velocidad de adhesión de los eritrocitos unidos sucesivamente a las amibas era en realidad constante. Para ello, en los experimentos descritos en el apartado anterior para las cinéticas de adhesión bajo condiciones de velocidad submáxima, se cuantificaron los diferentes complejos de adhesión, es decir, los porcentajes de amibas que tenían uno, dos, tres o más GR adheridos en las muestras de cada tiempo de incubación y de cada GS usado.

Se encontró adhesión de los trofozoítos de las cinco cepas a un solo GR (complejos A_1) desde los 5 min, la cual se incrementó en forma asintótica en función del tiempo de incubación y como se esperaba por las condiciones experimentales, representó el mayor porcentaje del total de los complejos de adhesión con dos (A_2), tres (A_3), cuatro (A_4) y cinco (A_5) GR por amiba (Fig. 9).

Se observó la aparición de complejos con dos GR (A_2) desde los 5 min, pero solamente para las cepas HK-9 y HM-3; su incremento al igual que el de los complejos A_1 fué claramente asintótico en función del tiempo de incubación, y a los 40 min representaban el 11.7% (HK-9) y 6.9% (HM-3) del total de complejos. Para las cepas HM-1, HM-2 y HM-38 la aparición de estos complejos fué posterior a los 5 min; su incremento fué lineal a lo largo del tiempo de incubación y representó solamente 2.2%, 2.3% y 0.9% del total de complejos a los 40 min de incubación, respectivamente (ver Fig. 9).

Los complejos con tres GR adheridos (A_3) tuvieron una aparición muy lenta y en la mayoría de las cepas se apreciaron a partir de

FIGURA 9. Cinética de formación de complejos de amibas con uno o más GR adheridos. De los experimentos descritos en la Fig. 7 también se cuantificó el número de amibas que tenían uno (○), dos (●), tres (□), cuatro (■) o cinco (△) GR adheridos. La figura representa el promedio de los nueve experimentos hechos con los tres GS en cada cepa amibiana.

los 10 min de incubación (ver Fig. 9). La proporción de complejos A_3 en las cepas HK-9 (5.5%) y HM-3 (1.3%) fué mayor que las de las cepas restantes, a los 40 min de incubación.

La formación de complejos A_4 y A_5 se encontró únicamente con trofozoítos de la cepa HK-9; sin embargo, su número fué tan bajo que tales resultados no pudieron analizarse con confianza.

Estos resultados indican que en este sistema experimental; la adhesión de los GR es un evento secuencial, y que las cepas que tienen mayor V_0 y los mayores porcentajes de adhesión, son también las que más GR pueden adherir a su superficie.

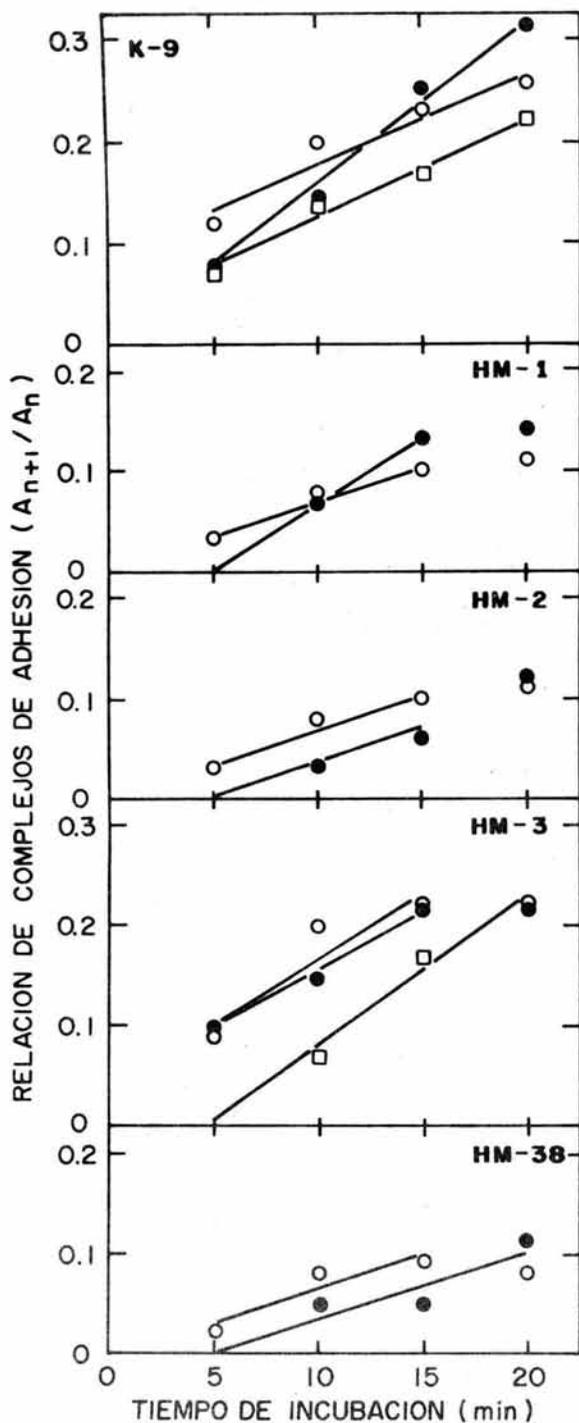
Por otra parte, el análisis de la relación entre los complejos (A_{n+1}/A_n), es decir, la relación entre A_1 con la población inicial de amibas (A_1/A_0), A_1 con A_2 (A_2/A_1) y A_2 con A_3 (A_3/A_2); mostró que tales relaciones fueron lineales durante los primeros 15 o 20 min de incubación (Fig. 10).

Las pendientes de las curvas formadas por las relaciones A_1/A_0 y A_2/A_1 , en las cepas HM-2 y HM-38 fueron semejantes entre sí (0.007); el valor de las pendientes fué aproximadamente el doble (0.013) en la cepa HM-3 para las mismas relaciones e incluso para la relación A_3/A_2 . En cambio, las pendientes de las curvas formadas por la relación A_2/A_1 de las cepas HK-9 y HM-1, tuvieron un valor cercano al doble del de las pendientes obtenidas en la relación A_1/A_0 (0.017 y 0.013, respectivamente).

Las conclusiones generales de esta etapa del trabajo son las siguientes:

1) Existen dos grupos con características claramente opuestas en las cinco cepas de E. histolytica que hemos estudiado: a) el de las cepas HK-9 y HM-3 que tienen la mayor V_0 , los mayores porcentajes de adhesión, que adhieren el mayor número de GR, y cuya adhesión a GR "O" es diferente a la adhesión de GR "A" y "B"; y b) el de las cepas HM-1, HM-2 y HM-38 que tienen menor V_0 , los menores porcentajes de adhesión, que adhieren solamente uno o dos GR, y

FIGURA 10. Relación de complejos de adhesión
 (A_{n+1}/A_n) en función del tiempo. Relaciones entre
 complejos de amibas con un GR adherido (A_1) y amibas
 libres (A_0), A_1/A_0 (\circ); complejos de amibas con
 dos GR adheridos (A_2) y complejos A_1 , A_2/A_1 (\bullet);
 y complejos de amibas con tres GR adheridos (A_3)
 y complejos A_2 , A_3/A_2 (\square).



cuya adhesión no es infuida por los GS mayores ABO.

2) Por lo tanto, las características antes señaladas constituyen parámetros específicos de adhesión para las cepas de E. histolytica.

G. Efecto de carbohidratos sobre la adhesión de los trofozoítos a glóbulos rojos de los grupos sanguíneos mayores ABO

Uno de los criterios más usados para conocer la naturaleza de las moléculas involucradas en la adhesión de los gérmenes patógenos, consiste en usar carbohidratos con la idea de observar posibles efectos inhibitorios competitivos de los mismos sobre la adhesión. Basados en estos hechos, en esta etapa del trabajo se usó este enfoque, como uno de los criterios iniciales para conocer la naturaleza de las moléculas involucradas en el reconocimiento de los GR por los trofozoítos de E. histolytica.

Para estos experimentos se utilizaron catorce monosacáridos o disacáridos, entre los que se encuentran los seis carbohidratos más comunes en la superficie de las células de mamífero (ver Tabla 1) y que forman parte de los receptores de otros microorganismos patógenos.

Debido a que esta sección del trabajo es la más extensa, se ha dividido en cinco partes que se describen a continuación.

1. Efecto general de los carbohidratos a concentración fija (50 mM)

Para la realización de estos experimentos, se incubaron mezclas con 10^4 amibas/ml (cepas: HK-9, HM-1, HM-2, HM-3 o HM-38) con 5 GR/amiba (de los GS A, B u O), por 10 min a temperatura ambiente en medio TP con o sin carbohidrato (50 mM).

Los catorce carbohidratos empleados, se dividieron en cuatro grupos principales: 1) grupo Gal en el que se incluyó a la Gal y sus análogos (GalNAc, Lac, Mel y Fuc); 2) grupo Glc en el que

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cuya adhesión no es infuida por los GS mayores ABO.

2) Por lo tanto, las características antes señaladas constituyen parámetros específicos de adhesión para las cepas de E. histolytica.

G. Efecto de carbohidratos sobre la adhesión de los trofozoítos a glóbulos rojos de los grupos sanguíneos mayores ABO

Uno de los criterios más usados para conocer la naturaleza de las moléculas involucradas en la adhesión de los gérmenes patógenos, consiste en usar carbohidratos con la idea de observar posibles efectos inhibitorios competitivos de los mismos sobre la adhesión. Basados en estos hechos, en esta etapa del trabajo se usó este enfoque, como uno de los criterios iniciales para conocer la naturaleza de las moléculas involucradas en el reconocimiento de los GR por los trofozoítos de E. histolytica.

Para estos experimentos se utilizaron catorce monosacáridos o disacáridos, entre los que se encuentran los seis carbohidratos más comunes en la superficie de las células de mamífero (ver Tabla 1) y que forman parte de los receptores de otros microorganismos patógenos.

Debido a que esta sección del trabajo es la más extensa, se ha dividido en cinco partes que se describen a continuación.

1. Efecto general de los carbohidratos a concentración fija (50 mM)

Para la realización de estos experimentos, se incubaron mezclas con 10^4 amibas/ml (cepas: HK-9, HM-1, HM-2, HM-3 o HM-38) con 5 GR/amiba (de los GS A, B u O), por 10 min a temperatura ambiente en medio TP con o sin carbohidrato (50 mM).

Los catorce carbohidratos empleados, se dividieron en cuatro grupos principales: 1) grupo Gal en el que se incluyó a la Gal y sus análogos (GalNAc, Lac, Mel y Fuc); 2) grupo Glc en el que

se incluyó a la Glc y sus análogos (GlcNAc, Mal y Sac); 3) grupo Man en el que estaban Man y dos análogos (ManNAc y m-Man) y 4) las pentosas Fru y Xil.

Se encontró inhibición de la adhesión amibiana por todos los carbohidratos utilizados (Figs. 11 a 15). La adhesión generalmente fué inhibida en proporción semejante por azúcares de un grupo dado, en todas las cepas y GS; sin embargo, existieron excepciones que por ello constituyen hallazgos interesantes. A continuación se describen los resultados por grupo de carbohidratos.

Grupo Gal. La adhesión relativa de trofozoítos de las cepas HK-9, HM-2, HM-3 y HM-38 en presencia de Mel, GalNAc, Lac y Gal siempre fué menor de 0.5 (Figs. 11, 13, 14 y 15, respectivamente) y para HM-1 menor de 0.2 (Fig. 12); en cambio con D-Fuc, la adhesión fué menor de 0.5 y llegó a ser mayor de 0.8 en casos como HM-2 (Fig. 13) y HM-38 (Fig. 15).

Grupo Glc. La adhesión fué poco inhibida con Glc o sus análogos. GlcNAc fué el carbohidrato que más la inhibió, especialmente con la cepa HM-38 en donde la adhesión relativa fué 0.4 con los GS "A" y "B", y 0.2 con el grupo "O" (Fig. 15). Sac y Mal inhibieron principalmente la adhesión de las cepas HM-1, HM-3 y HM-38 (Figs. 12, 14 y 15, respectivamente). La adhesión en presencia de Glc siempre fué mayor de 0.8, la mayoría de las veces su efecto fué similar al control e incluso en ciertas ocasiones mayor, como en la cepa HK-9 con GR "A" y GR "B" (Fig. 11) y en HM-1 y HM-2 con GR "A" (Figs. 12 y 13, respectivamente).

Grupo Man. Los carbohidratos de este grupo fueron más inhibitorios que los del grupo Glc, pero a la vez menos potentes que los del grupo Gal. La adhesión de los trofozoítos a GR "A" fué poco inhibida en presencia de Man, m-Man y ManNAc, excepto en la cepa HK-9 en la que el mayor efecto inhibitorio se observó con GR "B" (Fig. 11).

Pentosas. La adhesión relativa de los trofozoítos cuando Xil o Fru estuvieron presentes, en general fué mayor de 0.8, excepto

FIGURA 11. Efecto de diversos carbohidratos a concentración constante (50 mM) sobre la adhesión de trofozoítos de la cepa HK-9. Se prepararon sususpensiones amibianas y de GR de los GS 0 (⊗), A (⊞) y B (□) en medio TP al que se adicionaron azúcares específicos a concentración final 50 mM. Las mezclas con 10^4 amibas/ml y 5×10^4 GR/ml se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Los símbolos representan resultados obtenidos por triplicado y normalizados con respecto al control correspondiente (TP sin adiciones) en cada experimento.

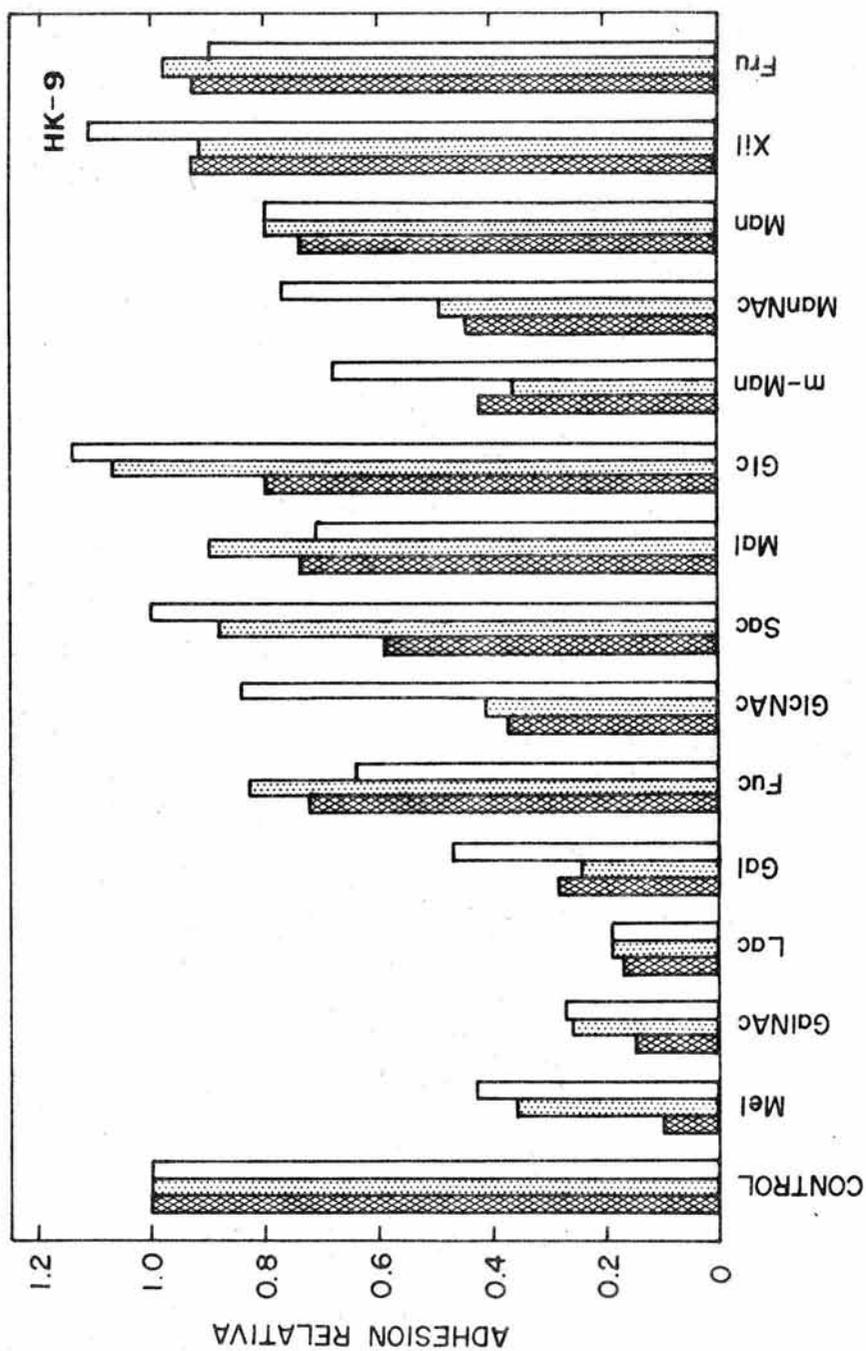


FIGURA 12. Efecto de diversos carbohidratos a concentración constante (50 mM) sobre la adhesión de trofozoítos de la cepa HM-1. Condiciones como en la Fig. 11. Glóbulos rojos de los GS 0 (⊗), A (⊞) y B (□).

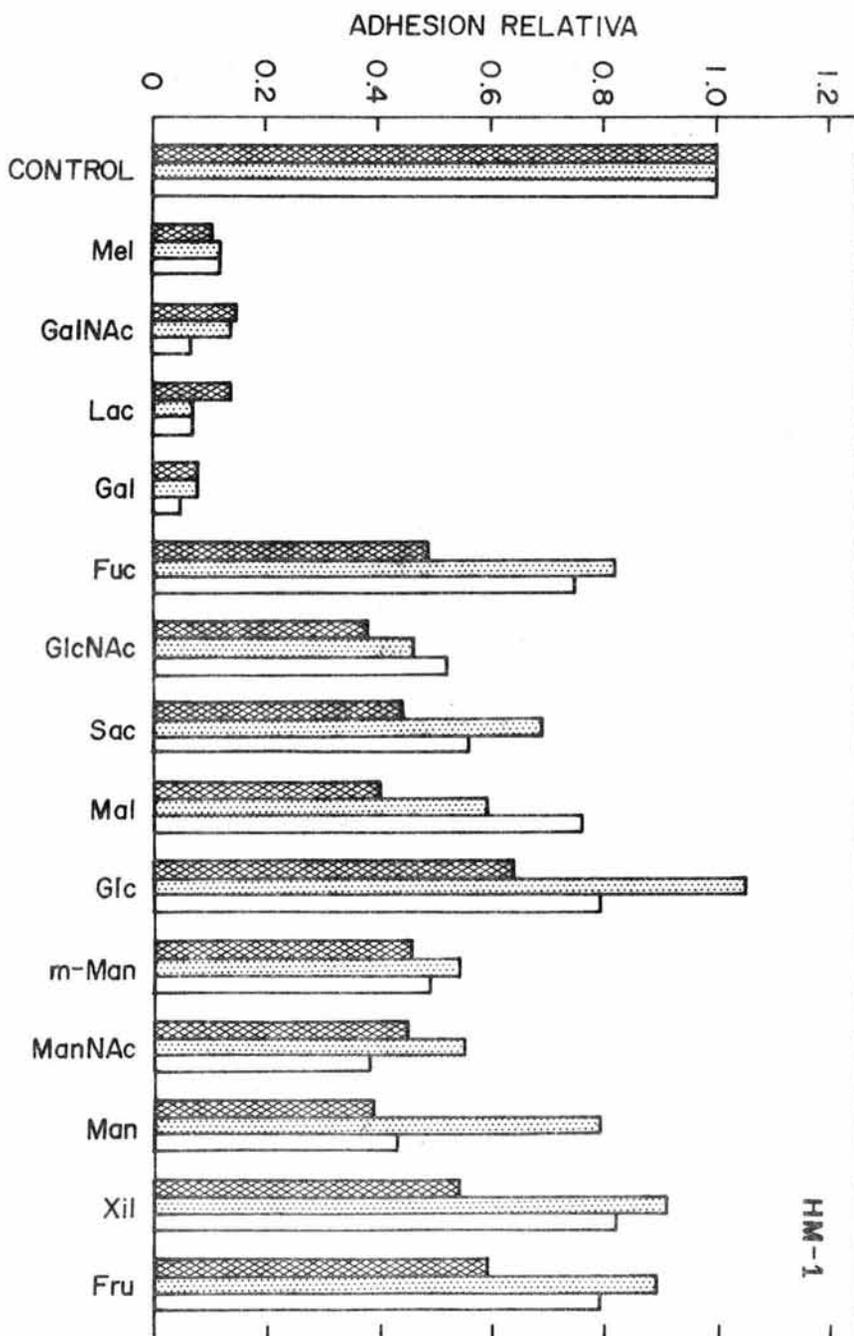


FIGURA 13. Efecto de diversos carbohidratos a concentración constante (50 mM) sobre la adhesión de trofozoítos de la cepa HM-2. Condiciones como en la Fig. 11. Glóbulos rojos de los GS O (■), A (▣) y B (□).

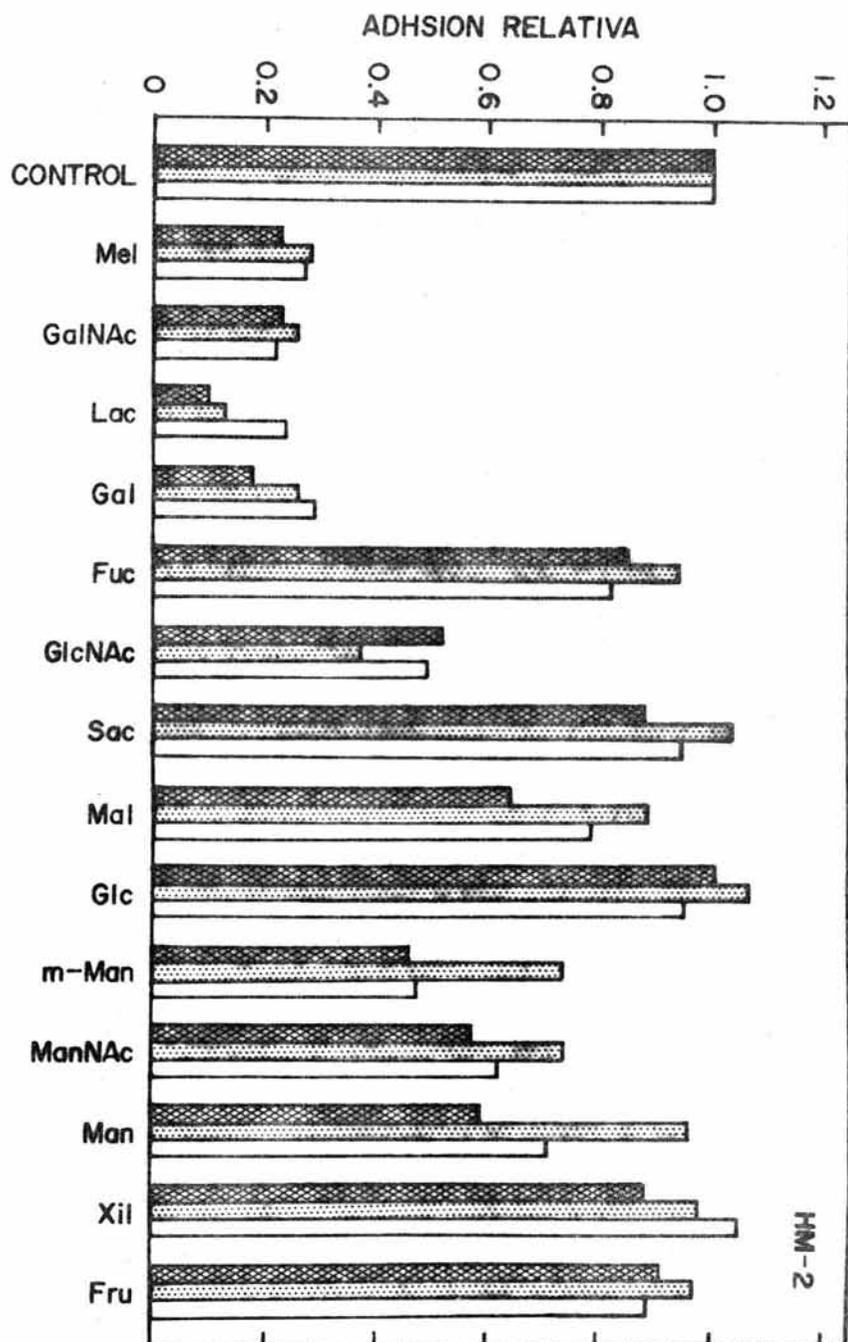


FIGURA 14. Efecto de diversos carbohidratos a concentración constante (50 mM) sobre la adhesión de trofozoítos de la cepa HM-3. Condiciones como en la Fig. 11. Glóbulos rojos de los GS O (⊗), A (⊞) y B (□).

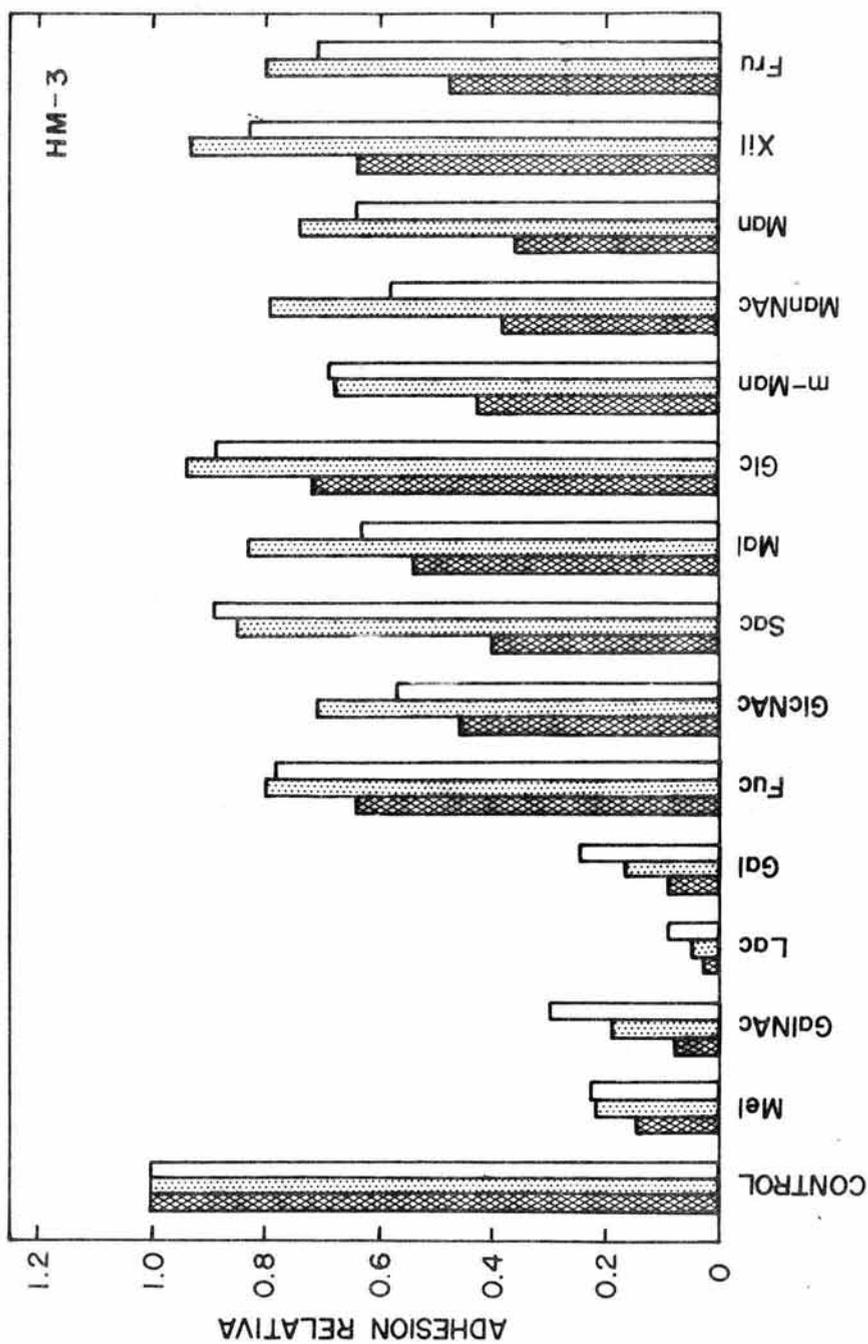
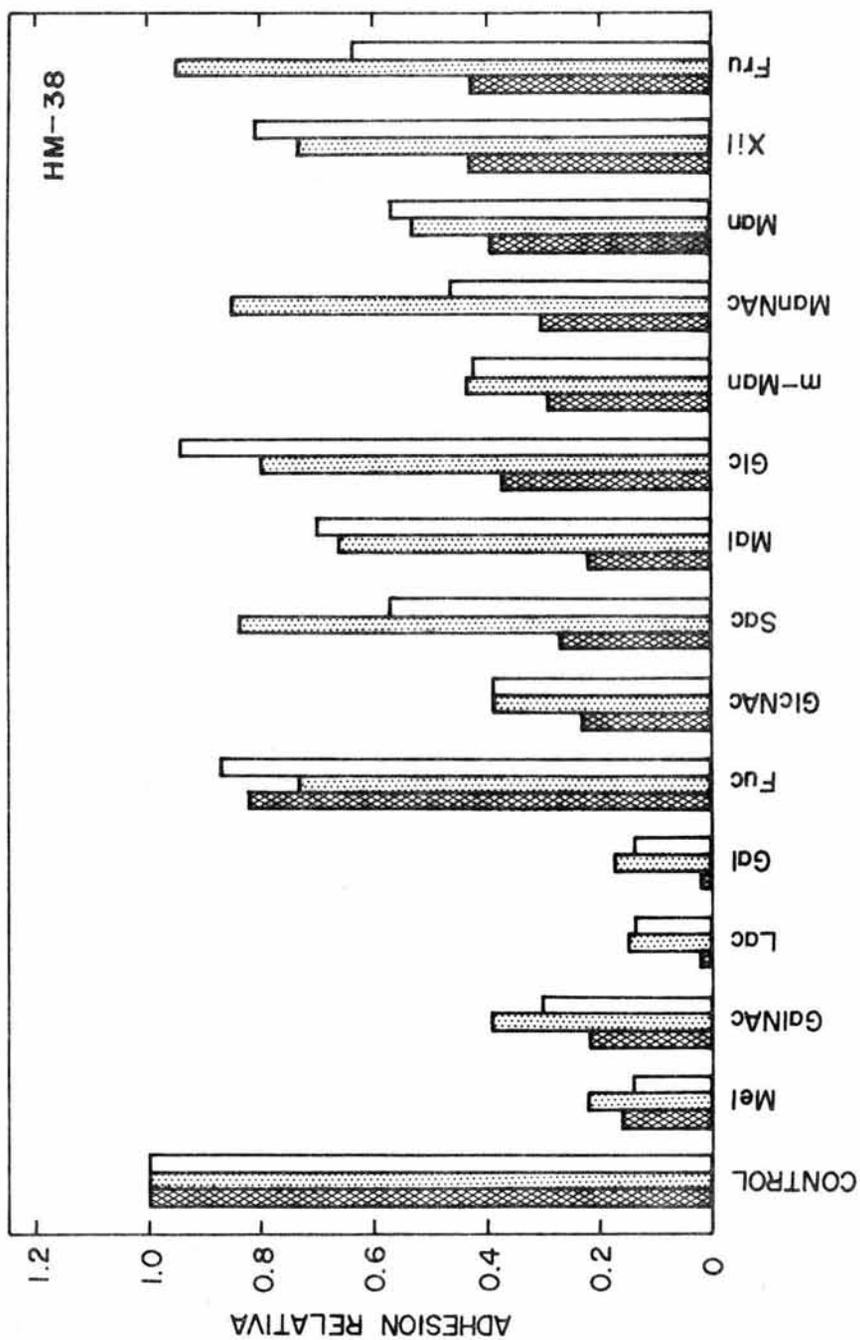


FIGURA 15. Efecto de diversos carbohidratos a concentración constante (50 mM) sobre la adhesión de trofozoítos de la cepa HM-38. Condiciones como en la Fig. 11. Glóbulos rojos de los GS 0 (), A () y B ().



con las cepas HM-1, HM-3 y HM-38 y GR "O" (Figs. 12, 14 y 15, respectivamente).

De estos experimentos se concluyó que existen tres residuos de carbohidratos involucrados en la adhesión amibiana; Gal, Glc y Man, cuyo efecto inhibitorio se observó claramente.

2. Análisis estadístico de la inhibición de la adhesión por los carbohidratos usados a concentración fija (50 mM)

Se analizó el efecto inhibitorio de cada carbohidrato mediante la prueba de t de Student, comparando la adhesión obtenida en presencia de cada azúcar, con la obtenida para cada control. Se consideró que la inhibición fué significativa para una $p \leq 0.05$.

Grupo Gal. Todos los carbohidratos de este grupo inhibieron significativamente la adhesión de los trofozoítos de las cinco cepas a los eritrocitos de los tres GS utilizados (Fig. 16). Lac inhibió la adhesión en mayor grado que el resto de los carbohidratos de este grupo, y su mayor efecto se encontró con la cepa HM-3 y los tres GS; mientras que GalNac, Gal y Mel inhibieron principalmente la adhesión de la cepa HM-1. Fuc en cambio, sólo tuvo efecto inhibitorio sobre la adhesión de la cepa HM-1 a GR "O" y GR "A", y de la cepa HM-2 también a GR "O".

Grupo Man. Se observó inhibición significativa en la mayoría de los casos. Las ocasiones en que la adhesión no fué significativa, se observaron con los GR "A" y "B". Por otra parte, la inhibición observada con ManNac, m-Man y Man, fué similar para todas las cepas (Fig. 17).

Grupo Glc. Como sucedió para el grupo Man, los casos en los que la inhibición de la adhesión no fué significativa, se observaron con los GR "A" y "B". La adhesión de trofozoítos de la cepa HM-2 fué inhibida significativamente sólo por GlcNac. Rara vez Glc inhibió significativamente la adhesión; únicamente con la cepa HK-9 y GR "A", y con las cepas HM-1 y HM-38 y GR "O" (Fig. 18).

FIGURA 16. Efecto de galactosa o sus análogos sobre la adhesión de trofozoítos de cinco cepas. Los resultados obtenidos con los carbohidratos GalNAc, Gal, Lac, Mel y Fuc graficados en las Figs. 11 a 15 se reagruparon. La figura muestra el efecto de cada uno de dichos azúcares sobre la adhesión de las cinco cepas a eritrocitos de los GS O (), A () y B (). Las flechas indican los casos en que la inhibición no fué significativa ($p > 0.05$).

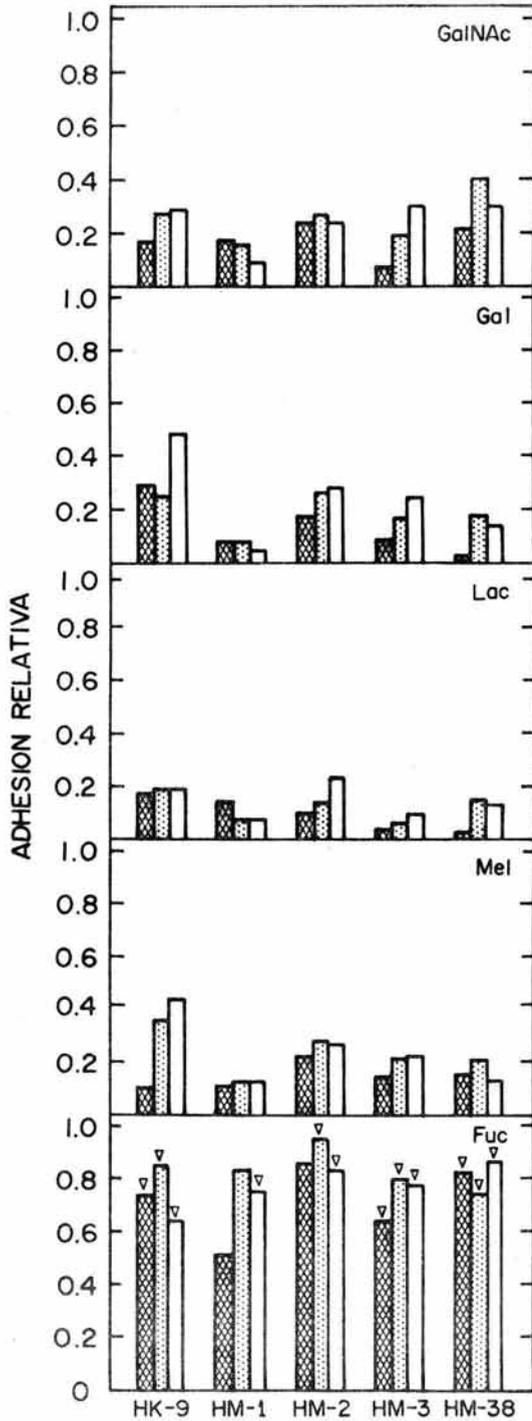


FIGURA 17. Efecto de manosa o sus análogos sobre la adhesión de trofozoítos de cinco cepas. Los resultados obtenidos con los carbohidratos ManNAc, m-Man y Man graficados en las Figs. 11 a 15, se reagruparon. La figura muestra el efecto de cada uno de dichos azúcares, sobre la adhesión de las cinco cepas a eritrocitos de los GS 0 (\otimes), A (\oplus) y B (\square). Las flechas indican los casos en que la inhibición no fué significativa ($p > 0.05$).

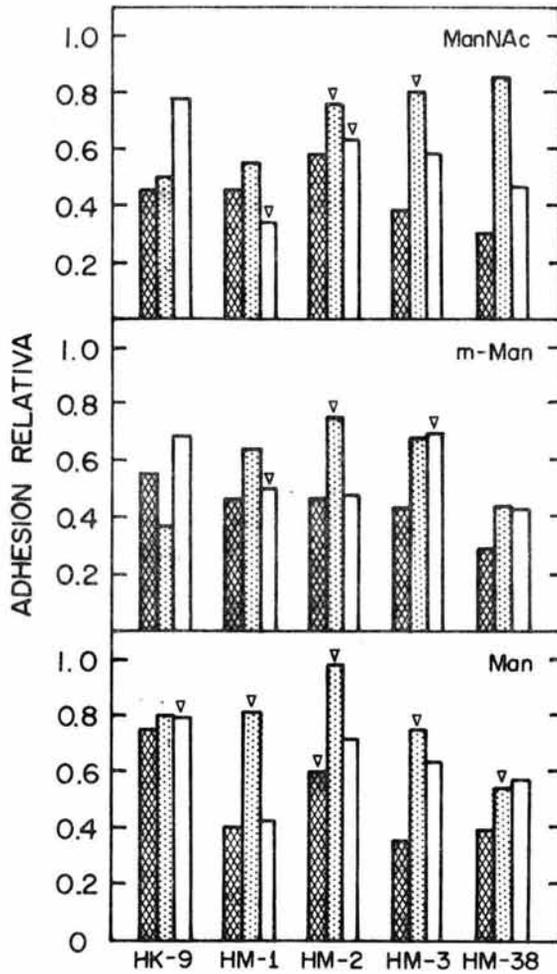
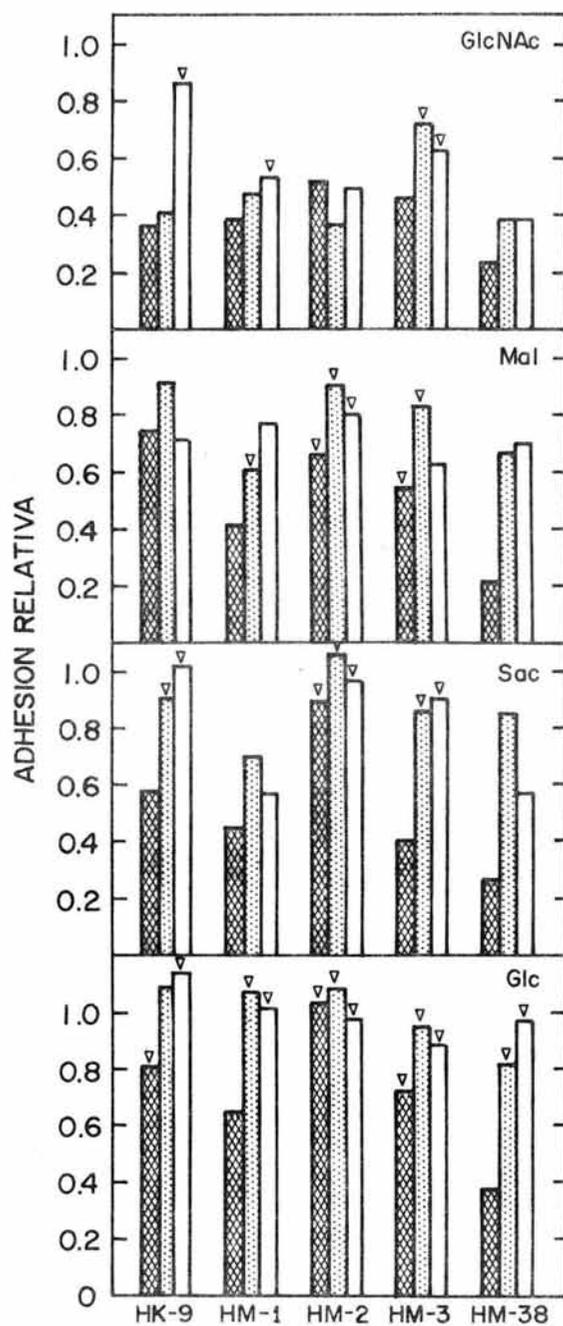


FIGURA 18. Efecto de glucosa o sus análogos sobre la adhesión de trofozoítos de cinco cepas. Los resultados obtenidos con los carbohidratos GlcNAc, Mal, Sac y Glc graficados en las Figs. 11 a 15 se reagruparon. La figura muestra el efecto de cada uno de los azúcares mencionados sobre la adhesión de las cinco cepas a eritrocitos de los GS 0 (\otimes), A (\boxtimes) y B (\square). Las flechas indican los casos en que la inhibición no fué significativa ($p > 0.05$).



Pentosas. Se encontró inhibición significativa sólo en raras ocasiones. Fru inhibió a la cepa HM-3 con los tres GS, a la cepa HM-1 cuando se incubó con GR "O" y "B", y sobre HM-38 con GR "O". Por otra parte, Xil únicamente inhibió a las cepas HM-1 y HM-38 con GR "O" (Fig. 19).

Con este análisis estadístico se confirmó que los carbohidratos involucrados principalmente en la adhesión amibiana contienen residuos de Gal, en seguida los que contienen residuos de Man y finalmente los que tienen residuos de Glc.

3. Frecuencia general de inhibición de la adhesión de las cinco cepas por los carbohidratos a concentración fija (50 mM)

Para conocer cuáles carbohidratos de cada grupo participaron mayormente en la inhibición de la adhesión, se cuantificó la frecuencia general de inhibición significativa que produjo cada azúcar a partir de las observaciones de las Figs. 16 a 19. La frecuencia máxima de inhibición a la que se podía llegar era 15 (que representaba el efecto inhibitorio significativo en los 15 experimentos hechos para cada carbohidrato con cinco cepas y los tres GS mayores ABO). Estos resultados se resumen en la Fig. 20.

La frecuencia máxima de inhibición ocurrió con cuatro azúcares del grupo Gal: Mel, GalNAc, Gal y Lac.

La frecuencia global de inhibición de GlcNAc y m-Man fué similar para ambos (11/15 y 12/15, respectivamente). La frecuencia inhibitoria de Man y ManNAc fué mayor (9/15) que la de los azúcares restantes del grupo Glc; Sac inhibió ocho veces, Mal siete veces y sólo tres Glc.

La menor frecuencia de inhibiciones se obtuvo con Fru (6/15), Fuc (3/15) y Xil (2/15).

FIGURA 19. Efecto de fructosa y xilosa sobre la adhesión de trofozoítos de cinco cepas. Los resultados obtenidos con los carbohidratos Fru y Xil graficados en las Figs. 11 a 15 se reagruparon. La figura representa el efecto de cada azúcar sobre la adhesión de las cinco cepas a eritrocitos de los GS O (), A () y B (). Las flechas indican los casos en que la inhibición no fué significativa ($p > 0.05$).

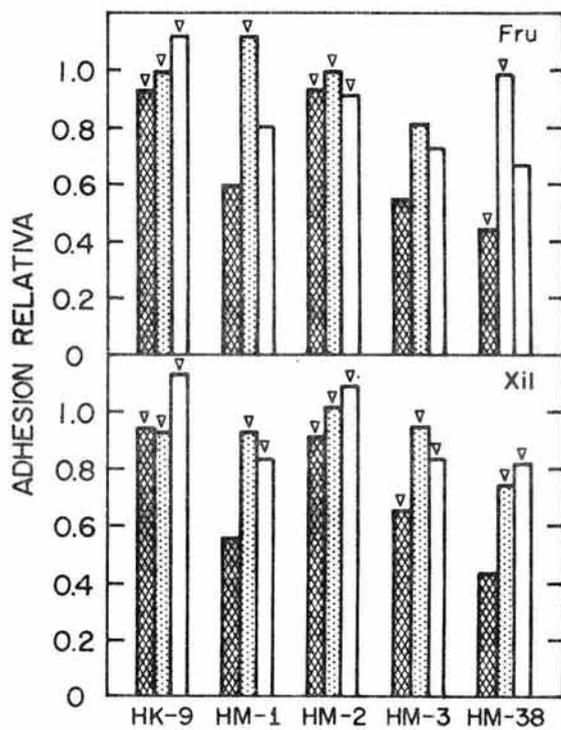
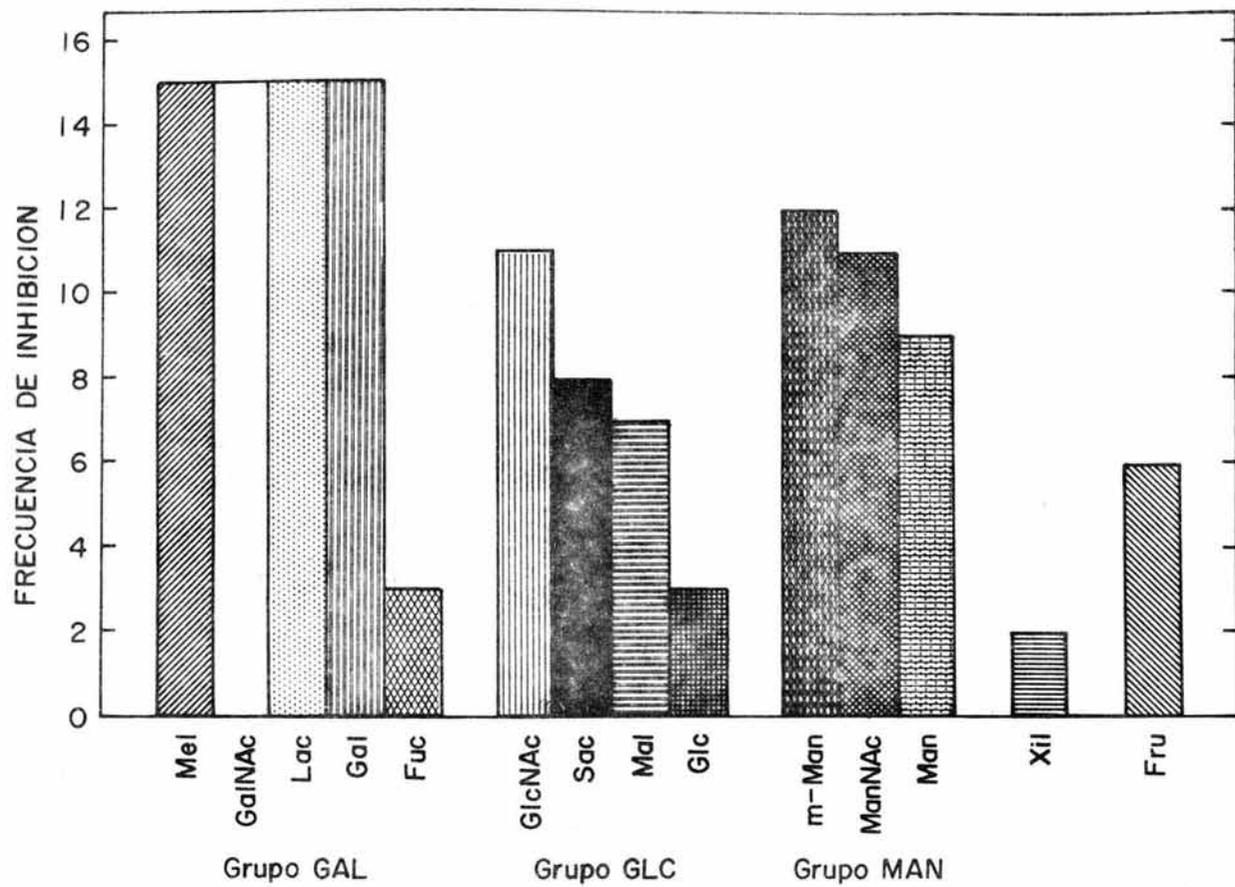


FIGURA 20. Frecuencia general de inhibición de la adhesión de las cinco cepas a GR de los grupos sanguíneos ABO por diversos carbohidratos. Se analizó estadísticamente los resultados de las Figs. 11 a 15, comparando la adhesión obtenida con cada carbohidrato, contra la adhesión encontrada en el control correspondiente (sin adiciones) en cada uno de los experimentos realizados por cada cepa para cada GS. Las barras representan la frecuencia de inhibición significativa ($p \leq 0.05$) de cada carbohidrato, en un total de 15 experimentos (cinco cepas y tres GS). Carbohidratos agrupados por poseer un monosacárido común o ser análogos.



Estos hallazgos confirmaron la observación preliminar de que el grupo Gal era el que intervenía mayormente en la adhesión, e hizo suponer que la principal adhesina amibiana media la adhesión a través del reconocimiento de los azúcares de éste grupo.

4. Frecuencia de inhibición de la adhesión de cada cepa amibiana por carbohidratos agrupados según su composición

Para observar cómo era la inhibición de cada cepa por cada uno de los grupos de carbohidratos; de manera similar, a partir de las Figs. 16 a 19, se cuantificó la frecuencia de inhibición significativa de la adhesión que cada grupo de carbohidratos causó en cada una de las cinco cepas estudiadas. De esta manera las frecuencias máximas que se podían obtener eran: 15 para el grupo Gal (cinco azúcares y tres GS), 12 para el grupo Glc (cuatro azúcares y tres GS), 9 para el grupo Man (tres azúcares y tres GS) y 3 para Xil o Fru. Estos resultados se resumen en la Fig. 21.

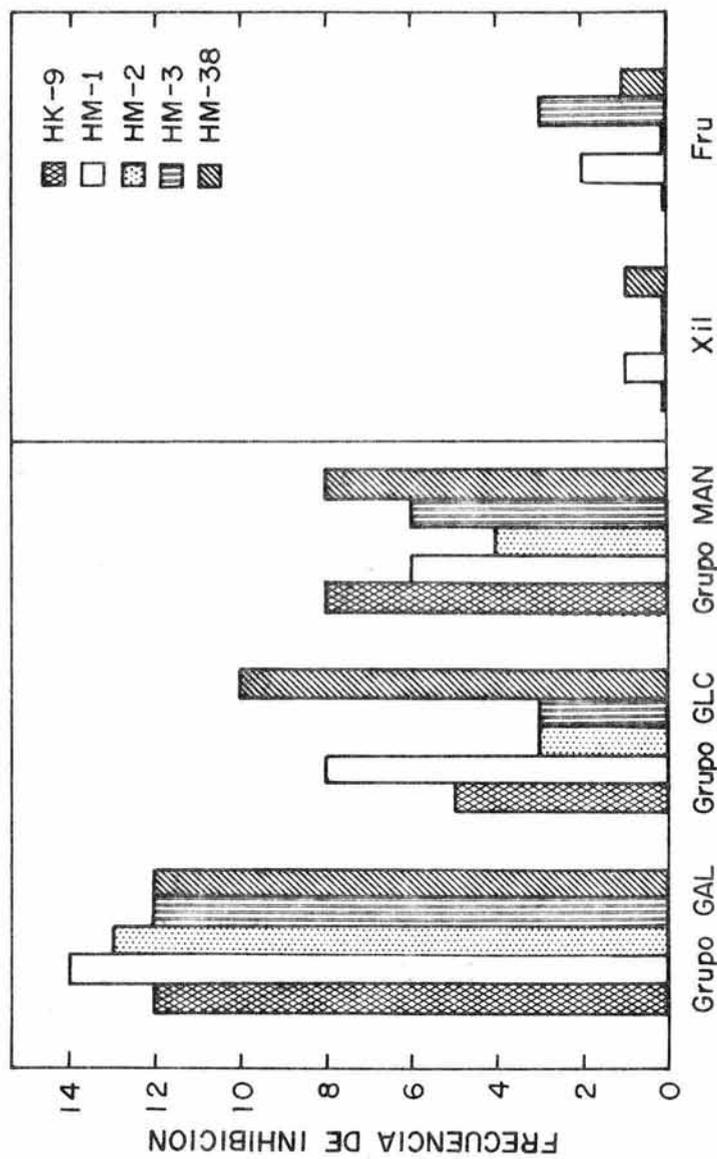
Con Mel, GalNac, Lac y Gal; se encontró la misma frecuencia de inhibición para todas las cepas (12/15), las diferencias observadas para las cepas HM-1 (14/15) y HM-2 (13/15) corresponden a las inhibiciones encontradas con Fuc.

Los residuos de Glc inhibieron principalmente a la cepa HM-38 (10/12); le siguieron HM-1 (8/12) y HK-9 (5/12), y finalmente HM-2 y HM-3 (3/12).

En el grupo Man se separaron por una parte; las cepas HK-9 y HM-38, que fueron similares y además con mayor frecuencia inhibitoria (8/9) que el resto de las cepas; por otro lado, las cepas HM-1 y HM-3 (6/9); y por último HM-2 (4/9).

Xil tuvo efectos significativos únicamente sobre las cepas HM-1 y HM-38 (1/3); Fru, además de inhibir en ocasiones a HM-1 (2/3) y a HM-38 (1/3), tuvo siempre efecto sobre HM-3 (3/3).

FIGURA 21. Frecuencia de inhibición de la adhesión de cada cepa amibiana por carbohidratos agrupados según su composición. La figura representa la frecuencia con que cada grupo de carbohidratos inhibió significativamente ($p \leq 0.05$) la adhesión de cada una de las cepas estudiadas, en un total de 15 experimentos para el grupo Gal (cinco azúcares), 12 experimentos para el grupo Glc (cuatro azúcares), 9 experimentos para el grupo Man (tres azúcares) y tres experimentos para Xil o Fru.



Estos hallazgos constituyen evidencia clara de que hay patrones específicos de cepa en la inhibición de la adhesión por diferentes carbohidratos. Estos patrones, a su vez, probablemente indican que hay diferencias cualitativas y/o cuantitativas en las adhesinas amibianas, las cuales quizá tienen también grados variables de afinidad por los azúcares inhibitorios correspondientes.

5. Frecuencia de inhibición de la adhesión de eritrocitos de los grupos sanguíneos mayores ABO a trofozoítos de las cinco cepas, por carbohidratos agrupados según su composición

Debido a que los grupos sanguíneos mayores poseen distintos determinantes antigénicos, era interesante analizar la frecuencia de inhibición de los carbohidratos en relación con cada GS utilizado (la frecuencia de inhibición significativa se obtuvo, a partir de las Figs. 16 a 19).

La frecuencia máxima de inhibición significativa correspondió, al total de experimentos realizados con cada grupo de carbohidratos en las cinco cepas. Para el grupo Gal el máximo fué 25 (cinco azúcares), para el grupo Glc fué 20 (cuatro azúcares), para el grupo Man fué 15 (tres azúcares) y para Xil o Fru fué 5. Estos resultados se resumen en la Fig. 22.

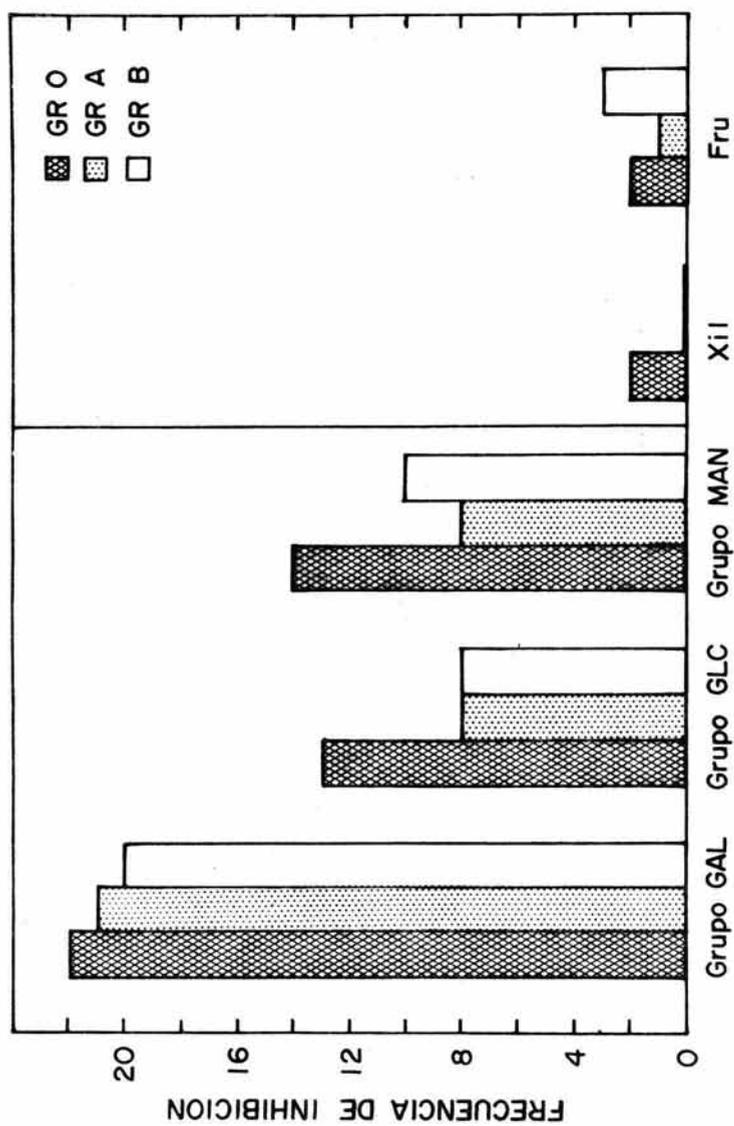
Generalmente la inhibición fué mayor cuando la adhesión se practicó con GR "O", aunque en ningún caso llegó a ser máxima.

Con los carbohidratos del grupo Gal, la frecuencia de inhibición fué la misma para los tres GS ABO (20/25); las diferencias observadas entre los GS "O" y "A" en el grupo Gal, corresponden a las inhibiciones encontradas con Fuc.

La frecuencia de inhibición por residuos de Glc y Man para el GS "O", fué 13/20 y 14/15, respectivamente. En el grupo Glc, además fué igual la frecuencia inhibitoria para GS "A" y "B" (8/20).

Xil sólo inhibió al GS "O", mientras que Fuc inhibió a los tres GS ABO.

FIGURA 22. Frecuencia de inhibición de la adhesión de eritrocitos de los grupos sanguíneos mayores ABO a trofozoítos de cinco cepas, por carbohidratos agrupados según su composición. La figura representa la frecuencia con que cada grupo de carbohidratos inhibió significativamente ($p \leq 0.05$) la adhesión de los eritrocitos de cada uno de los GS O, A y B en las cinco cepas. El total de experimentos fué: 25 para el grupo Gal, 20 para el grupo Glc, 15 para el grupo Man y cinco para Xil o Fru.



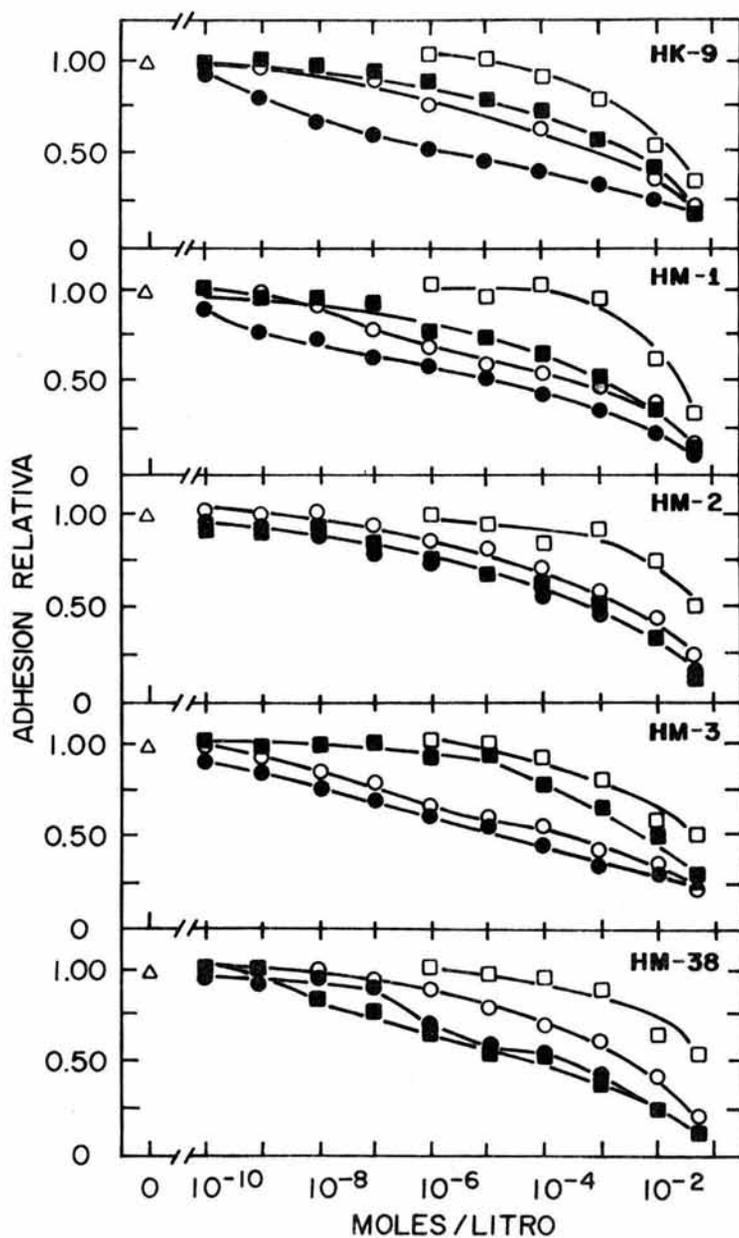
Estos hallazgos también constituyen una evidencia clara de que en la superficie de los GR de GS "O" existen diferencias cualitativas y/o cuantitativas involucradas en el reconocimiento de éstos GR por las amibas; dichas diferencias se deben principalmente a los residuos de Glc y Man. El hecho de no haber encontrado diferencias con los carbohidratos más importantes del grupo Gal (Mel, GalNAc, Lac y Gal) no apoya la idea de que los determinantes antigénicos de los GS "A" (GalNAc) y "B" (Gal) participen de manera específica en la adhesión amibiana.

H. Efecto de la concentración de Gal, GalNAc, GlcNAc y ManNAc sobre la adhesión amibiana

Era importante conocer la potencia absoluta y relativa de los carbohidratos que fueron inhibidores significativos de la adhesión (ver Fig. 20). Sin embargo, como constituiría un trabajo demasiado extenso hacer los experimentos correspondientes con cada uno de tales carbohidratos, se seleccionaron únicamente cuatro azúcares: del grupo Gal se escogió a la GalNAc y Gal; del grupo Glc a la GlcNAc que fué el azúcar más inhibitorio; y del grupo Man, como no hubo diferencias entre el efecto observado con m-Man y ManNAc (ver Fig. 20), se eligió a éste último carbohidrato porque también tiene un grupo acetamido en el carbono 2 de la molécula, como la GalNAc y la GlcNAc.

Se encontró que la adhesión disminuyó en relación directa con la concentración del carbohidrato empleado. Todas las curvas obtenidas fueron asintóticas con una sola inflexión, excepto para la cepa HM-3 en la cual las obtenidas con GalNAc y Gal tendieron a ser lineales, y para la cepa HM-38 en la cual la obtenida con GalNAc pareció ser sigmoide. Se observó inhibición de la adhesión por GalNAc, Gal y ManNAc con concentraciones 10^{-7} M o mayores de cada carbohidrato; con GlcNAc no se observó inhibición de la adhesión, con concentraciones menores de 10^{-5} M (Fig. 23).

FIGURA 23. Efecto de la concentración de Gal, GalNAc, GlcNAc y ManNAc sobre la adhesión amibiana. Se probó el efecto de concentraciones variables de carbohidratos, cuyos efectos inhibitorios sobre la adhesión fueron significativos a concentración 50 mM, en mezclas con 10^4 amibas/ml y 5 GR/amiba. Los símbolos representan el promedio de tres experimentos hechos con Gal (○), GalNAc (●), ManNAc (■) y GlcNAc (□).



Para comparar en forma precisa la potencia inhibitoria de los cuatro carbohidratos, se calculó la dosis inhibitoria media (DI_{50}), es decir, la concentración con la que se obtuvo 50% de inhibición de la adhesión, mediante interpolación en cada una de las curvas dosis-respuesta obtenidas.

La DI_{50} de GalNac fué en general mucho menor que la obtenida para los carbohidratos restantes; ésto significó que GalNac fué el inhibidor más potente de la adhesión en todas las cepas, excepto para la cepa HM-38, en la cual el inhibidor más potente fué ManNac, cuya DI_{50} resultó ser 1.6 veces menor que la de GalNac (Tabla 7). GlcNac fué el menos potente de los cuatro azúcares en todas las cepas y su DI_{50} varió desde 14.4 mM en la cepa HK-9 hasta 50 mM en las cepas HM-2 y HM-38.

El orden de mayor a menor potencia inhibitoria de los carbohidratos fué: 1) para las cepas HK-9, HM-1 y HM-3, GalNac > Gal > ManNac > GlcNac; 2) para la cepa HM-2, GalNac > ManNac > Gal > GlcNac; y 3) para la cepa HM-38, ManNac > GalNac > Gal > GlcNac (Tabla 7).

A pesar de que podría esperarse que las DI_{50} de Gal y GalNac fueran similares debido a su semejanza estructural, Gal fué menos potente que GalNac (Tabla 8). Este hallazgo, junto con lo encontrado por Cano-Mancera (tesis doctoral, comunicación personal), quien observó que la inhibición por GalNac + Gal era de tipo "aditivo"; es decir, que el efecto observado con la combinación de éstos carbohidratos era igual a la suma de los efectos inhibitorios observados con cada carbohidrato en forma individual; sugieren que GalNac y Gal pueden encontrarse en receptores diferentes.

De estos resultados se concluye que: 1) la inhibición de la adhesión amibiana por carbohidratos es específica de cepa; 2) existen al menos tres residuos de carbohidratos que participan en la adhesión a los GR humanos: Gal, Man y Glc; y 3) los residuos de Gal son los que participan de una manera más importante en la adhesión de la mayoría de las cepas, aunque hay cepas en las que los residuos de Man son los más importantes.

TABLA 7. Comparación de la potencia inhibitoria de cuatro carbohidratos sobre la adhesión a GR humanos de cinco cepas de E. histolytica

Carbohidrato	DI ₅₀ ^a (μM)				
	HK-9	HM-1	HM-2	HM-3	HM-38
GalNAc	1.3	.18	681	50	237
Gal	2412	464	4217	274	4394
ManNAc	3162	1468	1179	9006	147
GlcNAc	14424	18302	50000	38312	50000

^aConcentración de cada carbohidrato que inhibe 50% la adhesión. Calculada por interpolación a partir de los experimentos de la Fig. 23.

TABLA 8. Diferencia entre
la DI_{50} de Gal y GalNAc
en las cinco cepas
amibianas

Cepa	$DI_{50}^{Gal}/DI_{50}^{GalNAc}$
HK-9	1855
HM-1	26
HM-2	6
HM-3	5
HM-38	18

^aDatos experimentales en la
Tabla 7.

Las conclusiones generales acerca del efecto de carbohidratos sobre la adhesión de E. histolytica a GR humanos, son las siguientes:

1) existen al menos tres residuos de carbohidratos involucrados en la adhesión de los trofozoítos de E. histolytica a los GR humanos: Gal, Man y Glc.

2) El orden de mayor a menor potencia inhibitoria de éstos residuos de carbohidratos es: Gal > Man > Glc.

3) Existen patrones específicos de cepa amibiana en la inhibición por carbohidratos.

4) Los determinantes antigénicos de los GS "A" y "B" no parecen participar de manera específica en la adhesión amibiana.

VI. DISCUSION

El presente trabajo es una extensión de la caracterización de la adhesión de los trofozoítos de E. histolytica a glóbulos rojos humanos iniciada en el laboratorio por Cano-Mancera (1981); y ha tenido como finalidad contribuir al conocimiento de las cualidades fisicoquímicas y moleculares de la adhesión de E. histolytica a células animales, para tratar de definir el papel de la adhesión en la virulencia amibiana. Para ello, se dividió al trabajo en tres partes generales: en la primera, se afinó el modelo experimental para cuantificar la V_0 , obteniendo condiciones de velocidad submáxima en la cinética de adhesión; en la segunda se investigó el posible cambio en la velocidad de adhesión de GR sucesivos a complejos amiba-GR; y una tercera etapa en la que se exploró el efecto inhibitorio de carbohidratos a concentración fija sobre la adhesión y además, se estudió la potencia inhibitoria de azúcares específicos sobre la misma.

A. Cuantificación de la velocidad inicial de adhesión de trofozoítos a glóbulos rojos

Para cuantificar la V_0 se empleó el sistema experimental desarrollado previamente en el laboratorio (Cano-Mancera, 1981; López-Revilla y Cano-Mancera, 1982), en el que se utilizan mezclas de amibas y GR a concentración conocida, en suspensión. Este sistema, en contraste con el utilizado por otros grupos (i.e., monocapas de células) tiene las siguientes ventajas: 1) evita la sedimentación natural (provocada por la fuerza de gravedad) de los trofozoítos sobre las células, 2) permite que la colisión entre amibas y GR ocurra al azar, 3) permite estudiar el proceso cinéticamente como

las reacciones entre sustancias químicas en solución y por lo tanto, 4) permite cuantificar con precisión la V_0 de los trofozoítos de diferentes cepas amibianas.

Sabíamos entonces, que este sistema funcionaba como una reacción entre sustancias químicas en solución, obedeciendo a la ley de acción de masas; es decir, que la formación de complejos amiba-eritrocito dependía de la concentración inicial de amibas y GR; y por lo tanto, que la velocidad de adhesión era modificada por la concentración celular (de amibas y de GR). Debido a que las concentraciones que se usaban inicialmente eran 10^4 amibas/ml y 10^6 GR/ml, decidimos averiguar el efecto de la disminución en la concentración de GR sobre la velocidad de adhesión, ya que no parecía conveniente disminuir la concentración amibiana porque la cantidad que se observaba microscópicamente en las muestras de adhesión utilizando 10^4 amibas/ml era apenas suficiente, y disminuir aún más su concentración dificultaría la observación y la confiabilidad de los resultados.

Efecto de la concentración de glóbulos rojos

La V_0 de los trofozoítos fué directamente proporcional a la concentración de GR (Fig. 4). Con concentraciones entre 10^5 y 6×10^5 GR por ml, la V_0 fué "submáxima" a diferencia de la V_0 "máxima" obtenida en las condiciones del trabajo previo, en el que se emplearon 10^6 GR/ml (Cano-Mancera, 1981; López-Revilla y Cano-Mancera, 1982).

Decidimos afinar estos resultados, y para ello probamos un intervalo de concentración de GR que fué desde 10^4 hasta 6×10^5 por ml. Bajo estas condiciones encontramos que la V_0 fué directamente proporcional a la concentración de GR. Concluimos entonces, que teníamos las condiciones que definían un sistema sensible y preciso para la medición de la V_0 . Estas condiciones fueron: 1) 10^4 amibas/ml, 2) 10^4 a 6×10^5 GR por ml y 3) un período de incubación de 5 min.

Debido a que al disminuir la concentración de GR la velocidad fué submáxima, como habíamos previsto, no fué necesario modificar la concentración de amibas.

Bajo estas condiciones de velocidad submáxima extendimos el estudio a cinco cepas de E. histolytica (Fig. 5). La V_0 en todos los casos fué proporcional a la concentración de GR en todo el intervalo, y obtuvimos constantes de velocidad (A) que constituyen parámetros específicos de cepa amibiana (Tabla 3 y 4).

Por otra parte, para definir las condiciones bajo las cuales las curvas de la cinética de adhesión con velocidad submáxima fueran lineales, se hicieron experimentos con tres de las concentraciones de GR que ofrecieron velocidad submáxima ($1, 2$ y 5×10^4 GR por ml) y trofozoítos de la cepa HK-9 (una de las más rápidas). Encontramos que 5×10^4 GR/ml era la concentración adecuada para realizar el estudio comparativo de la cinética de adhesión de las cinco cepas amibianas; ya que, la adhesión fué directamente proporcional al tiempo de incubación en un intervalo más amplio (15 min, Fig. 6).

Cinética de adhesión de cinco cepas a GR humanos de los grupos sanguíneos mayores ABO, bajo condiciones de velocidad submáxima

Al analizar las cinéticas de adhesión de cada cepa con GR de los GS mayores ABO en las nuevas condiciones de velocidad submáxima, no se encontraron diferencias en la adhesión de los trofozoítos a los GR de diferente GS; excepto en las cepas HK-9 y HM-3 en donde hubo una clara separación entre las cinéticas obtenidas con GR "O" y las obtenidas con GR "A" y GR "B" que a su vez fueron similares entre sí (Fig. 7). Este hallazgo sugiere que la adhesión de los trofozoítos de las cepas HM-1, HM-2 y HM-38 parece estar mediada por componentes comunes en los GR, que son diferentes a los determinantes de los GS mayores ABO y que la adhesión de trofozoítos de las cepas HK-9 y HM-3 pudiese ser similar al de las primeras cepas (particularmente para el GS "O"), y estar mediada también por los determinantes antigénicos de los GS "A" (GalNAc) y "B" (Gal).

Bajo tales condiciones, las cinéticas de adhesión promedio resultantes de las cinéticas hechas con cada una de las cepas y los tres GS, también fueron lineales durante los 15 min iniciales de incubación (Fig. 8); y también constituyen parámetros específicos de cepa amibiana (Tabla 5 y 6).

Cabe resaltar la clara separación de dos grupos de cepas amibianas: el primero, formado por HK-9 y HM-3 (con V_0 más altas y de valor similar) y el segundo constituido por las cepas HM-1, HM-2 y HM-38 (con V_0 menores y con valores diferentes cada una).

Estos hallazgos indicaron que no existe correlación entre la V_0 y la virulencia amibiana. Así, por ejemplo, la cepa HM-1, reconocida como una de las más virulentas por su capacidad de formar abscesos hepáticos en el hígado de hámsters recién nacidos (Mattern y Keister, 1977 citados por Mirelman y Kobiler, 1981), por su efecto citotóxico en células de hígado de hámsters pequeños (Bos, 1979 citado por Mirelman y Kobiler, 1981), y por la capacidad de fagocitar GR (Orozco *et al.*, 1983) tuvo una V_0 2.2 veces menor que la de las cepas HK-9 y HM-3 que se sabe son menos virulentas por los criterios mencionados.

Por lo tanto, parece que la adhesión de los trofozoítos a células animales es un factor quizá necesario pero no suficiente para la virulencia amibiana, ya que también debe ocurrir en las amibas de los portadores asintomáticos.

Las conclusiones de esta parte del trabajo fueron: 1) la V_0 y la cinética de adhesión constituyen parámetros específicos de cepa amibiana, 2) existen dos grupos de cepas amibianas, de acuerdo con los parámetros antes mencionados: HK-9 y HM-3 (más rápidas y comparables entre ellas) y HM-1, HM-2 y HM-38 (más lentas y diferentes entre ellas), y 3) no hay correlación directa entre la V_0 específica de cepa y la virulencia amibiana.

En resumen, las nuevas condiciones establecidas mediante los experimentos de esta primera parte fueron cruciales. Por una parte, permitieron la cuantificación precisa de la V_0 de cada cepa amibiana

y por lo tanto la comparación de este parámetro, y por la otra, volvieron al sistema experimental más lento y con ello potencialmente más sensible al efecto inhibitorio de carbohidratos que pudieran competir con la unión de las moléculas de la superficie amibiana involucradas en la adhesión.

B. Cinética de formación de complejos de adhesión específicos

Como el modelo matemático de la adhesión amibiana desarrollado por Hernández-Lerma et al. (1982) propone la existencia de tasas de asociación para la formación de complejos amiba-GR, quisimos saber si dichas tasas eran iguales o diferentes para la adhesión sucesiva de GR.

Los resultados indicaron que bajo las condiciones de este sistema experimental la adhesión de los GR es un evento secuencial y que las cepas que tienen mayor V_0 y los mayores porcentajes de adhesión son también las que más GR pueden adherir a su superficie (Fig. 9). Por otra parte, el hecho de que las curvas obtenidas en el análisis de la relación entre los diferentes complejos de una cepa dada hayan sido paralelas entre sí; es decir, que sus pendientes hayan sido similares, parece indicar que la velocidad de adhesión de GR sucesivos no varía; sin embargo, esto no debe tomarse como una evidencia totalmente concluyente debido a la baja cantidad de complejos con más de dos GR adheridos que se obtuvieron en estos experimentos.

C. Efecto de carbohidratos sobre la adhesión amibiana

En años recientes, las investigaciones referentes a los mecanismos de adhesión amibiana, han reportado datos interesantes. La posibilidad de que la lectina amibiana descrita por Kobiler y Mirelman (1980) -la cual es inhibida por oligómeros de GlcNAc- participe en la adhesión, ha sido apoyada por el trabajo de Orozco et al. (1982),

en el que también se observó inhibición por GlcNac_2 de la adhesión de los trofozoítos a células MDCK y láminas epiteliales de intestino de cobayo. Sin embargo, estos resultados contrastan con los hallazgos de Ravdin y Guerrant (1981), quienes encontraron que la adhesión de trofozoítos a células CHO y a GR humanos es inhibida por GalNac pero no por oligómeros de GlcNac.

Como la participación de moléculas involucradas en la adhesión amibiana dista mucho de haber sido aclarada, resultaba de interés explorar el efecto inhibitorio de una batería razonablemente abundante de carbohidratos, entre los que se localizaran algunos de los azúcares más comunes en la superficie de células de mamífero. Para ello, se realizaron experimentos en los que se probaron catorce carbohidratos (monosacáridos o disacáridos), primero a concentración fija, sobre la adhesión amibiana a GR.

Efecto general de carbohidratos a concentración fija (50 mM)

La adhesión amibiana fué inhibida por la mayoría de los carbohidratos utilizados en proporción semejante por azúcares de un grupo dado en todas las cepas amibianas y con todos los GS (Figs. 11 a 15). Estos datos sugieren que por lo menos existen tres residuos de carbohidratos involucrados en la adhesión: Gal, Man y Glc.

Sin embargo, la adhesión fué inhibida más frecuentemente por los carbohidratos del grupo Gal, que por los de los demás grupos (Fig. 20). Esto concuerda con el efecto inhibitorio de GalNac encontrado por Ravdin y Guerrant (1981), por lo que hace suponer que Gal y sus análogos son las principales moléculas implicadas en la adhesión.

Entre los azúcares del grupo Gal se encontró además que Lac inhibió en mayor grado la adhesión (Fig. 16). Analizando su fórmula estructural (Fig. 24), observamos que este carbohidrato consiste de una molécula de Gal unida por un enlace 1 + 4 a una molécula de Glc; es decir, existe un enlace β -glucosídico, el cual parece hacer más eficiente la inhibición de la adhesión.

En las Figs. 24 a 26 se muestran las estructuras de cada uno de los carbohidratos utilizados en esta etapa experimental, en las que pueden analizarse las diferencias que existen entre las mismas, para cada grupo de carbohidratos.

Se encontró que en la inhibición de la adhesión por carbohidratos existen patrones específicos de cepa amibiana que pueden significar diferencias cualitativas y/o cuantitativas en las adhesinas amibianas (Fig. 21).

También, se encontraron evidencias claras a favor de la existencia de diferencias cualitativas y/o cuantitativas en la superficie de los GR de GS "O", debidas principalmente a los residuos de Glc y Man (Fig. 22). Creemos que los determinantes antigénicos de los GS "A" (GalNAc) y "B" (Gal), no participan de manera específica en la adhesión de los trofozoítos a los GR humanos, ya que el análisis estadístico de la inhibición de la adhesión por el grupo Gal no reveló diferencias en la adhesión de las cinco cepas a los GR de los tres GS mayores ABO, pero sí hubo diferencias debidas principalmente a los residuos de Glc y Man (Figs. 20 a 22).

Efecto de la concentración de Gal, GalNAc, GlcNAc y ManNAc

Al analizar el efecto de la concentración de Gal, GalNAc, GlcNAc y ManNAc, encontramos patrones específicos de cepa amibiana en cuanto a la potencia inhibitoria de los azúcares, de manera que el orden de mayor a menor potencia inhibitoria de los carbohidratos fué: 1) para las cepas HK-9, HM-1 y HM-3, GalNAc > Gal > ManNAc > GlcNAc; 2) para la cepa HM-2, GalNAc > ManNAc > Gal > GlcNAc; y 3) para la cepa HM-38, ManNAc > GalNAc > Gal > GlcNAc (Fig. 23 y Tabla 7).

A pesar de que podría esperarse que las DI_{50} de Gal y GalNAc fueran similares debido a su semejanza estructural (Fig. 24), Gal fué menos potente que GalNAc (Tabla 8). Este hallazgo, junto con lo encontrado por Cano-Mancera (tesis doctoral, comunicación personal), quién observó que la inhibición por GalNAc + Gal era de tipo "aditivo";

FIGURA 24. Fórmulas estructurales de carbohidratos del grupo Gal.

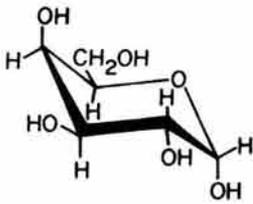
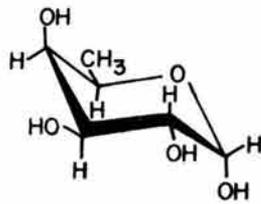
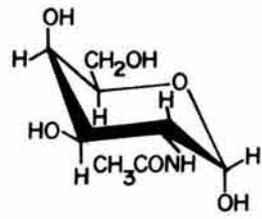
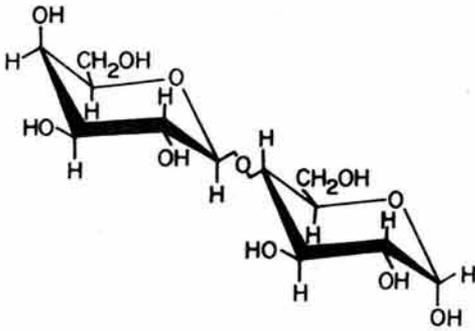
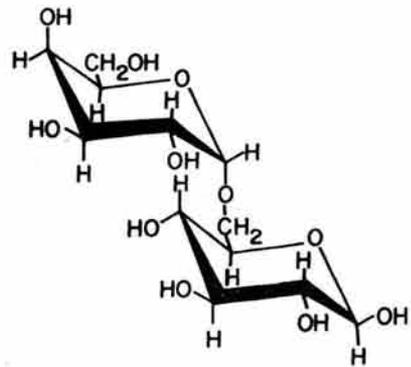
**Gal****D-Fuc****GalNAc****Lac****Mel**

FIGURA 25. Fórmulas estructurales de carbohidratos del grupo Man.

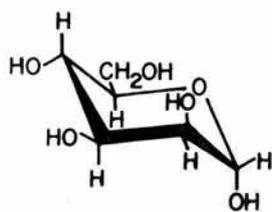
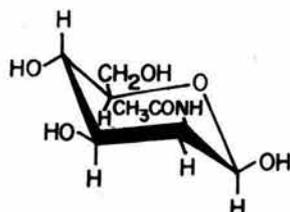
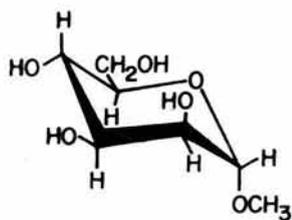
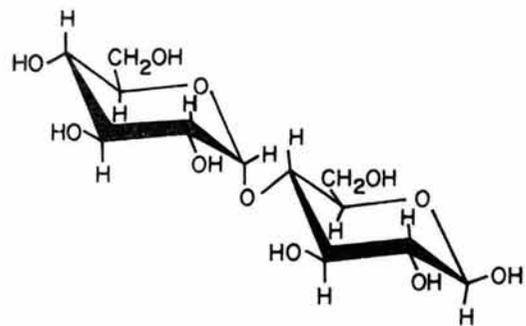
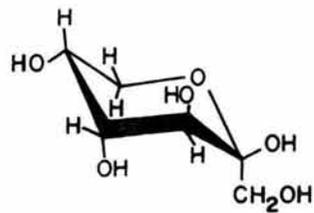
**Man****ManNAc****m-Man**

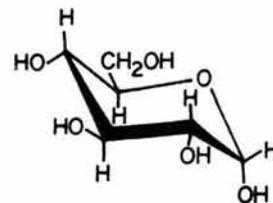
FIGURA 26. Fórmulas estructurales de Fru, Xil y carbohidratos del grupo Glc.



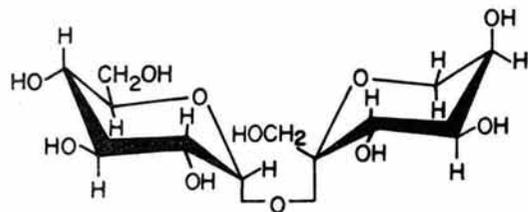
Mal



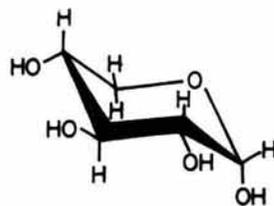
Fru



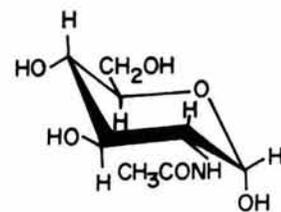
Glc



Sac



Xil



GlcNAc

es decir, que el efecto observado con la combinación de estos carbohidratos era igual a la suma de los efectos inhibitorios observados con cada carbohidrato en forma individual, sugieren que GalNac y Gal pueden encontrarse en receptores diferentes.

Creemos que debido a la gran batería de carbohidratos que se utilizó, entre los que se encuentran los más comunes en la superficie de las células de mamífero (Tabla 1) y que forman parte de los receptores de los microorganismos patógenos, es muy poco probable que en la adhesión de las amibas a los GR humanos exista otro residuo de carbohidrato que participe en este reconocimiento.

Finalmente, es importante mencionar que la participación del residuo de Man en la adhesión de E. histolytica a células animales no ha sido descrito anteriormente, por lo que en el contexto de este trabajo, constituye un hallazgo interesante.

VII. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

1) Definimos las condiciones experimentales de velocidad submáxima que permiten la cuantificación precisa de parámetros de la cinética de adhesión amibiana.

2) La velocidad inicial de adhesión, la cinética de adhesión, el número de glóbulos rojos adheridos y la adhesión a glóbulos rojos de diferente grupo sanguíneo son parámetros de adhesión específicos de cepa amibiana.

3) Existen dos grupos de cepas amibianas de acuerdo con los parámetros antes mencionados: HK-9 y HM-3 (más rápidas y comparables entre ellas) y HM-1, HM-2 y HM-38 (más lentas y diferentes entre ellas).

4) Los determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos "A" y "B" no parecen participar de manera específica en la adhesión amibiana.

5) No parece haber correlación directa entre los parámetros de adhesión estudiados y la virulencia reportada de las cepas amibianas.

6) La especificidad de la adhesión amibiana parece estar determinada por componentes de la superficie celular inhibibles por carbohidratos específicos.

7) Existen al menos tres residuos de carbohidratos que participan en la adhesión amibiana: Gal, Man y Glc.

8) El orden de mayor a menor potencia inhibitoria de estos residuos de carbohidratos es: Gal > Man > Glc.

9) La participación de residuos de Man constituye un hallazgo nuevo para la adhesión de E. histolytica a células animales.

10) Los patrones de inhibición de la adhesión ambiental por carbohidratos son específicos de cepa.

VIII. REFERENCIAS

- Acres SD, Isaacson RE, Babiuk LA, Kapitany RA. 1979. Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. *Infect Immun* 25: 121-126.
- Allen FH Jr. 1984. Blood groups. Immunogenetics, chemistry and clinical significance of red cell antigens. *Clin Immunol Allerg* 4: 457-472.
- Alsever JB, Ainslie RB. 1941. A new method for the preparation of dilute blood plasma and the operation of a complete transfusion service. *New York State J Med* 41: 126-135.
- Andrews NW, Colli W. 1982. Adhesion and interiorization of Trypanosoma cruzi in mammalian cells. *J Protozool* 29: 264-269.
- Aoyama H, Okada TS y Takeichi M. 1980. Analysis of the cell adhesion mechanism using somatic cell hybrids. I. Aggregation of hybrid cells between adhesive V79 and non-adhesive Ehrlich's ascites tumor cells. *J Cell Sci* 43: 391-406.
- Arbuthnott JP, Smyth CJ. 1979. Bacterial adhesion in host/pathogen interactions in animals. In: DC Ellwood, J Melling, P Rutter (eds). *Adhesion of microorganisms to surface*. Academic Press, London, 1979.
- Atkinson HM, Trust TJ. 1980. Hemagglutination properties and adherence ability of Aeromonas hydrophila. *Infect Immun* 27: 938-946.
- Attridge SR, Rowley D. 1983. The role of the flagellum in the adherence of Vibrio cholerae. *J Infect Dis* 147: 864-872.

- Banai M, Kahane I, Razin S, Bredt W. 1978. Adherence of Mycoplasma gallisepticum to human erythrocytes. *Infect Immun* 21: 365-372.
- Banai M, Razin S, Bredt W, Kahane I. 1980. Isolation of binding sites to glycophorin from Mycoplasma pneumoniae membranes. *Infect Immun* 30: 628-234.
- Banks KL. 1979. In vitro binding of Trypanosoma congolense to erythrocytes. *J Protozool* 26: 103-108.
- Baseman JB, Banai M, Kahane I. 1982. Sialic acid residues mediate Mycoplasma pneumoniae attachment to human and sheep erythrocytes. *Infect Immun* 38: 389-391.
- Baxt B, Morgan DO, Robertson BH, Timpone CA. 1984. Epitopes on foot-and-mouth disease virus outer capsid protein VP₁ involved in neutralization and cell attachment. *J Virol* 51: 298-305.
- Beachey EH. 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* 143: 325-343.
- Benchimol M, De Souza W. 1981. Leishmania mexicana amazonensis: attachment to the membrane of the phagocytic vacuole of macrophages in vivo. *Z Parasitenkd* 66: 25-30.
- Biagi F. 1976. Enfermedades parasitarias. La Prensa Medica Mexicana, México. 358 p.
- Bing DH, Weyand JGM, Stavitsky AB. 1967. Hemagglutination with aldehyde fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc Soc Exp Biol Med* 124: 1166-1170.
- Bracha R, Kobilier D, Mirelman D. 1982. Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of Entamoeba histolytica. *Infect Immun* 36: 396-406.

- Bracha R, Mirelman D. 1983. Adherence and ingestion of Escherichia coli serotype 055 by trophozoites of Entamoeba histolytica. Infect Immun 40: 882-887.
- Brandt H, Pérez-Tamayo R. 1970. Amibiasis. La Prensa Médica Mexicana. México. 104 p.
- Bray RS. 1983. Leishmania mexicana mexicana attachment and uptake of promastigotes to an by macrophages in vitro. J Protozool 30: 314-321.
- Brennan MJ, Cisar JO, Vatter AE, Sandberg AL. 1984. Lectin-dependent attachment of Actinomyces naeslundii to receptor on epithelial cells. Infect Immun 46: 459-564.
- Bulma IGW, de Nijs A, van der Meer C, Frik JF. 1982. Different pig phenotypes affect adherence of Escherichia coli to jejunal brush borders by K88ab, K88ac or K88ad antigen. Infect Immun 37: 891-894.
- Cano-Mancera R. Caracterización de la adhesión de trofozoítos de Entamoeba histolytica a glóbulos rojos humanos. México, DF: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN 1981, 92 p. Tesis Maestría (Biología Celular).
- Cantey JR, Lushbaugh WB, Inman LR. 1981. Attachment of bacteria to intestinal epithelial cells in diarrhea caused by Escherichia coli strain RDEC-1 in the rabbit: stages and role of capsule. J Infect Dis 143: 219-230.
- Centeno A, Davis CP, Cohen MS, Warren MM. 1983. Modulation of Candida albicans attachment to human epithelial cells by bacteria and carbohydrates. Infect Immun 39: 1354-1360.
- Chandler DKF, Grabowski MW, Barile MF. 1982. Mycoplasma pneumoniae attachment: competitive inhibition by mycoplasmal binding component and by sialic acid-containing glycoconjugates. Infect Immun 38: 598-603.

- Cheney CP, Boedeker EC, Formal SB. 1979. Quantitation of the adherence of an enteropathogenic Escherichia coli to isolated rabbit intestinal brush borders. *Infect Immun* 26: 736-743.
- Cheney CP, Formal SB, Schad PA, Boedeker EC. 1983. Genetic transfer of a mucosal adherence factor (R1) from an enteropathogenic Escherichia coli strain into a Shigella flexneri and the phenotypic suppression of this adherence factor. *J Infect Dis* 147: 711-723.
- Cheng CT. 1978. *Parasitología general*. Editorial AC. España. 965 p.
- Collier AM. 1983. Attachment by mycoplasmas and its role in disease. *Rev Infect Dis* 5: S685-S691.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng K-J. 1978. How bacteria stick. *Sci Amer* 238: 86-95.
- Daughaday CC, Brandt WE, McCown JM, Russell PK. 1981. Evidence for two mechanisms of Dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infect Immun* 32: 469-473.
- Davis CP, Avots-Avotins AE, Fader RC. 1981. Evidence for a bladder cell glycolipid receptor for Escherichia coli and the effect of neuraminic acid and colominic acid on adherence. *Infect Immun* 34: 944-948.
- Dean EA, Isaacson RE. 1982. In vitro adhesion of piliated Escherichia coli to small intestinal villous epithelial cells from rabbits and the identification of a soluble 987P pilus receptor-containing fraction. *Infect Immun* 36: 1192-1198.
- de Graaf FK, Klaasen-Boor P, van Hees JE. 1980. Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine. *Infect Immun* 30: 125-128.

- de Graaf FK, Roorda I. 1982. Production, purification, and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic Escherichia coli strain B41M. *Infect Immun* 36: 751-758.
- de Graaf FK, Wientjes FB, Klaasen-Noor P. 1980. Production of K99 antigen by enterotoxigenic Escherichia coli strains of antigen groups 08, 09, 020, and 0101 grown at different conditions. *Infect Immun* 27: 216-221.
- De la Torre M, De la Hoz R, Filloy L. 1974. Cultivos axénicos de cepas mexicanas de E. histolytica HM-2:IMSS y HM-3:IMSS. *Arch Invest Med* 5: 279-282.
- Deneke CF, McGowan K, Larson AD, Gorbach SL. 1984. Attachment of human and pig (K88) enterotoxigenic Escherichia coli strains to either human or porcine small intestinal cells. *Infect Immun* 45: 522-524.
- Diamond LS. 1968. Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 and E. histolytica-like amebae. *J Protozool* 54: 1047-1056.
- Eaton RDP, Meerovitch E, Costerton JW. 1970. The functional morphology of pathogenicity in Entamoeba histolytica. *Ann Trop Med Parasitol* 64: 299-304.
- Ellen RP, Gibbons RJ. 1974. Parameters affecting the adherence and tissue tropisms of Streptococcus pyogenes. *Infect Immun* 9: 85-91.
- Evans DG, Evans DJ Jr, Tjoa W. 1977. Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect Immun* 18: 330-337.
- Fasman GD, ed. Handbook of biochemistry and molecular biology. Lipids, carbohydrates, steroids. 3th edition. Cleveland, Ohio: CRC Press 1975: 137-481.

- Feely DE, Schollmeyer JV, Erlandsen SL. 1982. Giardia spp: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp Parasitol* 53: 145-154.
- Fein JE. 1981. Screening of uropathogenic Escherichia coli for expression of mannose-sensitive adhesins: importance of cultura conditions. *J Clin Microbiol* 13: 1088-1095.
- Feldner J, Bredt W, Kahane I. 1979. Adherence of erythrocytes to Mycoplasma pneumoniae. *Infect Immun* 25: 60-67.
- Frazier W, Glaser L. 1979. Surface component and cell recognition. *Annu Rev Biochem* 48: 491-523.
- Freter R, Jones GW. 1983. Models for studying the role of bacterial attachment in virulence and pathogenesis. *Rev Infect Dis* 5: S647-S658.
- Friedman MJ, Blankenberg T, Sensabaugh G, Tenforde TS. 1984. Recognition and invasion of human erythrocytes by malarial parasites: contribution of sialoglycoproteins to attachment and host specificity. *J Cell Biol* 98: 1672-1677.
- Friedman MJ, Fukuda M, Laine RA. 1985. Evidence for malarial parasite interaction site on the major transmembrane protein of the human erythrocyte. *Science* 228: 75-77.
- Fukushima K, Takada K, Motoda R, Ikeda T. 1982. Independence of water-insoluble glucan synthesis and adherence of Streptococcus mutans to smooth surfaces. *FEBS Letters* 149: 299-303.
- Gaastra W, de Graaf FK. 1982. Host-specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic Escherichia coli strains. *Microbiol Rev* 46: 129-161.
- García-Rivera G, Sánchez T, Orozco E, Guarneros G. 1982. Aislamiento de clones de E. histolytica deficientes en adhesión a eritrocitos humanos. *Arch Invest Med* 13: 129-136.

- Garrod DR, Nicol A. 1981. Cell behaviour and molecular mechanisms of cell-cell adhesion. *Biol Rev* 56: 199-242.
- Gibbons RA, Jones GQ, Sellwood R. 1975. An attempt to identify the intestinal receptor for the K88 adhesin by means of a haemagglutination inhibition test using glycoproteins and fractions from sow colostrum. *J Gen Microbiol* 86: 228-240.
- Gillin FD, Diamond LS. 1980. Attachment and short-term maintenance of motility and viability of Entamoeba histolytica in a defined medium. *J Protozool* 27: 220-225.
- Gillin FD, Diamond LS. 1981. Entamoeba histolytica and Giardia lamblia: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. *Exp Parasitol* 52: 9-17.
- González-Robles A, Martínez-Palomo A. 1983. Scanning electron microscopy of attached trophozoites of pathogenic Entamoeba histolytica. *J Protozool* 30: 692-700.
- Greaves MF. 1975. Cellular recognition. Chapman and Hall. Londres. 72 p.
- Griffin JL. 1972. Human amebic dysentery. Electron microscopy of Entamoeba histolytica contacting, ingesting, and digesting inflammatory cells. *Amer J Trop Med Hyg* 21: 895-906.
- Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA, Mandell GL. 1981. Interaction between Entamoeba histolytica and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis* 143: 83-93.
- Hernández-Lerma O, Cano-Mancera R, López-Revilla R. 1982. Modelos matemáticos de adhesión celular con aplicaciones a la adhesión de trofozoítos de Entamoeba histolytica. *Ciencia* 33: 107-117.
- Holmgren J, Svennerholm AM, Lindblad M. 1983. Receptor-like glycoconjugates in human milk that inhibit classical and El Tor Vibrio cholerae cell adherence (Haemagglutination). *Infect Immun* 39: 147-154.

- Honigberg BM, Balamuth W, Bovee EC, Corliss JO, Gojdics M, Hall RP, Kudo RR, Levine ND, Loeblich AR Jr, Weiser J, Wenrich DH. 1964. A revised classification of the phylum Protozoa. *J Protozool* 11: 7-20.
- Inman LR, Cantey JR. 1984. Peyer's patch lymphoid follicle epithelial adherence of a rabbit enteropathogenic Escherichia coli (strain RDEC-1). Role of plasmid-mediated pili in initial adherence. *J Clin Invest* 74: 90-95.
- Inman LR, Cantey JR. 1983. Specific adherence of Escherichia coli (strain RDEC-1) to membranous (M) cells of the Peyer's patch in Escherichia coli diarrhea in the rabbit. *J Clin Invest* 71: 1-8.
- Inoue M, Koga T, Sato S, Hamada S. 1982. Synthesis of adherent insoluble glucan by the concerted action of the two glucosyltransferase components of Streptococcus mutans. *FEBS Letters* 143: 101-104.
- Isaacson RE. 1980. Factors affecting expression of the Escherichia coli pilus K99. *Infect Immun* 28: 190-194.
- Isaacson RE, Dean EA, Morgan RL, Moon HW. 1980. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic Escherichia coli-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified K99 or 987P pili: antibody production in response to vaccination. *Infect Immun* 29: 824-826.
- Jarumilinta R, Kradolfer F. 1964. The toxic effect of Entamoeba histolytica on leucocytes. *Ann Trop Med Parasitol* 58: 375-381.
- Jones GW, Freter R. 1976. Adhesive properties of Vibrio cholerae: nature of the interaction with isolated rabbit brush border membranes and human erythrocytes. *Infect Immun* 14: 240-245.
- Jones GW, Isaacson RE. 1983. Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *CRC* 10: 229-260.

- Klemm P, Ørskov I, Ørskov F. 1983. Isolation and characterization of F12 adhesive fimbrial antigen from uropathogenic Escherichia coli strains. *Infect Immun* 40: 91-96.
- Knight R. 1977. An in vivo model for measuring the cytopathic effect on Entamoeba histolytica. *J Parasitol* 63: 388-389.
- Knight R, McCaul TF, Bird RG. 1974. The interaction between E. histolytica and rabbit cell (RK13) monolayers. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 67: 1
- Kobiler D, Mirelman D. 1981. Adhesion of Entamoeba histolytica trophozoites to monolayers of human cells. *J Infect Dis* 144: 539-546.
- Kobiler D, Mirelman D. 1980. Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. *Infect Immun* 29: 221-225.
- Kobiler D, Mirelman D, Mattern CFT. 1981. Lectin and toxin-like activities of Entamoeba histolytica: comparison of properties. *Amer J Trop Med Hyg* 30: 955-959.
- Kozel TR. 1977. Non-encapsulated variant of Cryptococcus neoformans. II. Surface receptor for cryptococcal polysaccharide and their role in inhibition of phagocytosis by polysaccharide. *Infect Immun* 16: 99-106.
- Krause DC, Baseman JB. 1983. Inhibition of Mycoplasma pneumoniae hemadsorption and adherence to respiratory epithelium by antibodies to a membrane protein. *Infect Immun* 39: 1180-1186.
- Kudo RR. 1979. *Protozoología*. Compañía editorial continental SA. México. 905 p.
- Labigne-Roussel AF, Lark D, Schoolnik G, Falkow S. 1984. Cloning and expression of an afimbrial adhesin (AFA-I) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from a pyelonephritic Escherichia coli strain. *Infect Immun* 46: 251-259.

- Lee JC, King RD. 1983. Characterization of Candida albicans adherence to human vaginal epithelial cells in vitro. *Infect Immun* 41: 1024-1031.
- Leith DK, Baseman JB. 1984. Purification of a Mycoplasma pneumoniae adhesin by monoclonal antibody affinity chromatography. *J Bacteriol* 157: 678-680.
- Liljemark WF, Bloomquist CG. 1981. Isolation of a protein-containing cell surface component from Streptococcus sanguis which affect its adherence to saliva-coated hydroxyapatite. *Infect Immun* 34: 428-434.
- Lindley M. 1980. Adhesion of pathogenic microorganisms. *Nature* 286: 556-557.
- López-Revilla R, Cano-Mancera R. 1982. Adhesion of Entamoeba histolytica trophozoites to human erythrocytes. *Infect Immun* 37: 281-285.
- López-Revilla R, Rodríguez-Báez J. 1981. Manual para el cultivo axénico de Entamoeba histolytica. *Ciencia y desarrollo*. México. 62 p.
- Lundblad G, Huldt G, Elander M, Lind J, Slettengren K. 1981. β -N-acetylglucosaminidase from Entamoeba histolytica. *Comp Biochem Physiol* 68B: 71-76.
- Markell EK, Voge M. 1981. Parasitología. Diagnóstico, prevención y tratamiento. El manual moderno SA. de CV. México. 429 p.
- Martínez-Palomo A. 1982. The biology of Entamoeba histolytica. Research Studies Press. Inglaterra. 161 p.
- McCaul TF, Bird RG. 1977. Surface features of Entamoeba histolytica and rabbit kidney (RK13) cell surface changes after trophozoites contact observations by scanning electron microscopy. *Int J Parasitol* 7: 383-388.

- Michel R, Hohmann R. 1979. The influence of cytochalasin B, colchicin, and vinblastine on the attachment of Entamoeba histolytica to glass surfaces. *Z Parasitenkd* 60: 123-133.
- Miller LH, Hudson D, Rener J, Taylor D, Hadley TJ, Zilberstein D. 1983. A monoclonal antibody to rhesus erythrocyte band 3 inhibits invasion by malaria (Plasmodium knowlesi) merozoites. *J Clin Invest* 72: 1357-1364.
- Minion FC, Cassell GH, Pnini S, Kahane I. 1984. Multiphasic interactions of Mycoplasma pulmonis with erythrocytes defined by adherence and hemagglutination. *Infect Immun* 44: 394-400.
- Mirelman D, Koblitz D. 1981. Adhesion properties of Entamoeba histolytica. In: Adhesion and microorganism pathogenicity. Pitman Medical, Tunbridge Wells. Ciba Foundation symposium 80: 17-35.
- Monroy A, Rosati F. 1979. The evolution of the cell-cell recognition system. *Nature* 278: 165-166.
- Mora-Galindo J, Martínez-Palomo A, Chávez B. 1978. Interacción entre Entamoeba histolytica y el epitelio cecal de cobayo. *Arch Invest Med* 9: 261-274.
- Mora-Galindo J, Martínez-Palomo A, González-Robles A. 1982. Interacción entre Entamoeba histolytica y epitelio cecal del cobayo. Estudio cuantitativo. *Arch Invest Med* 13: 233-244.
- Morgan RL, Isaacson RE, Moon HW, Brinton CC, To C-C. 1978. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic Escherichia coli-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 987 or K99 pili: protection correlates with pilus homology of vaccine and challenge. *Infect Immun* 22: 771-777.
- Morris EJ, McBride BC. 1984. Adherence of Streptococcus sanguis to saliva-coated hydroxiapatite: evidence for two binding sites. *Infect Immun* 43: 656-663.

- Morris JA, Thorns C, Scott AC, Sojka WJ, Wells GA. 1982. Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen (F41) produced by a K99 mutant of the reference strain Escherichia coli B41. *Infect Immun* 36: 1146-1153.
- Morris JA, Wray C, Sojka WJ. 1980. Passive protection of lambs against enteropathogenic Escherichia coli: role of antibodies in serum and colostrum of dams vaccinated with K99 antigen. *J Med Microbiol* 13: 265-271.
- Nagy B. 1980. Vaccination of cows with a K99 extract to protect newborn calves against experimental colibacillosis. *Infect Immun* 27: 21-24.
- Nagy B, Moon HW, Isaacson RE, To C-C, Brinton CC. 1978. Immunization of suckling pigs against enteric enterotoxigenic Escherichia coli infection by vaccinating dams with purified pili. *Infect Immun* 21: 269-274.
- Normark S, Lark D, Hull R, Norgren M, Båga M, O'Hanley P, Schoolnik G, Falkow S. 1983. Genetics of digalactoside-binding adhesin from uropathogenic Escherichia coli strains. *Infect Immun* 41: 942-949.
- Ofek I, Mirelman D, Sharon N. 1977. Adherence of Escherichia coli to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* 265: 623-625.
- Orozco ME. Efecto citopático de Entamoeba histolytica sobre células en cultivo. México, DF: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN 1978, pp. 66-69. Tesis de Maestría (Biología Celular).
- Orozco ME. Virulencia y propiedades de superficie de Entamoeba histolytica. México, DF: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN 1981, pp. 67-76. Tesis Doctoral (Biología Celular).

- Orozco E, Guarneros G, Martínez-Palomo A, Sánchez T. 1983. Entamoeba histolytica. Phagocytosis as a virulence factor. J Exp Med 158: 1511-1521.
- Orozco ME, Martínez-Palomo A, González-Robles A, Guarneros G, Mora Galindo J. 1982. Las interacciones entre lectina y receptor median la adherencia de E. histolytica a células epiteliales. Relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. Arch Invest Med 13: 159-167.
- Orozco ME, Martínez-Palomo A, Guarneros G, Kobiler D, Mirelman D. 1982. Receptores participantes en la adherencia de E. histolytica a eritrocitos humanos. Arch Invest Med 13: 177-184.
- Ørskov I, Ørskov F. 1966. Episome-carried surface antigen K88 of Escherichia coli. I. Transmission of the determinant of the K88 antigen and influence on the transfer of chromosomal markers. J Bacteriol 91: 69-75.
- Ørskov I, Ørskov H, Smith W, Sojka WJ. 1975. The establishment of K99, a thermolabile, transmissible Escherichia coli K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. Acta Pathol Microbiol Scand 83: 31-36.
- Ravdin JI, Croft BY, Guerrant RL. 1980. Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. J Exp Med 152: 377-390.
- Ravdin JI, Guerrant RL. 1981. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J Clin Invest 68: 1305-1313.
- Reis GJ, Vatter AE, Crowle AJ, Cisar JO. 1982. Antibodies against the Ag2 fimbriae of Actinomyces viscosus T14V inhibit lactose-sensitive bacterial adherence. Infect Immun 36: 1217-1222.

- Rosato RR, Cameron JA. 1964. The bacteriophage receptor sites of Staphylococcus aureus. *Biochim Biophys Acta* 83: 113-119.
- Sandin RL, Rogers AL, Patterson RJ, Beneke ES. 1982. Evidence for mannose-mediated adherence of Candida albicans to human buccal cells in vitro. *Infect Immun* 35: 79-85.
- Sellwood R, Gibbons RA, Jones GW, Rutter JM. 1975. Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to pig intestinal brush borders: the existence of two pig phenotypes. *J Med Microbiol* 8: 405-411.
- Sepúlveda B, Martínez-Palomo A. 1982. The immunology of amoebiasis produced by Entamoeba histolytica. In: *Immunology of Parasitic Infections*. S Cohen, KS Warren (eds). Blackwell Scientific Publications. Oxford. In press.
- Shaffer JG, Balsam T. 1954. Ability of Entamoeba histolytica to phagocytose red blood cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 85: 21-24.
- Smit H, Gaastra W, Kamerling JP, Vliegthart JFG, de Graaf FK. 1984. Isolation and structural characterization of the equine erythrocytes receptor for enterotoxigenic Escherichia coli K99 fimbrial adhesin. *Infect Immun* 46: 578-584.
- Sobel JD, Myers PG, Kaye D, Levison ME. 1981. Adherence of Candida albicans to human vaginal and buccal epithelial cells. *J Infect Dis* 143: 76-82.
- Sparling PF. 1983. Bacterial virulence and pathogenesis: an overview. *Rev Infect Dis* 5: S637-S646.
- Sugasawara RJ, Cannon JG, Black WJ, Nachamkin I, Sweet RL, Brooks GF. 1983. Inhibition of Neisseria gonorrhoeae attachment to HeLa cells with monoclonal antibody directed against a protein II. *Infect Immun* 42: 980-985.

- Svensson U, Persson R, Everitt E. 1981. Virus-receptor interaction in the adenovirus system. I. Identification of virion attachment proteins of the HeLa cell plasma membrane. *J Virol* 38: 70-81.
- Takeuchi A, Phillips BP. 1975. Electron microscope studies of experimental Entamoeba histolytica infection in the guinea pig. I. Penetration of the intestinal epithelium by trophozoites. *Amer J Trop Med Hyg* 24: 35-48.
- Thomas LV, Cravioto A, Scotland SM, Rowe B. 1982. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic Escherichia coli in humans. *Infect Immun* 35: 1119-1124.
- Treviño-García Manzo N, Cruz de Lavin E, Tanimoto-Weki M. 1978. Estudio ultramicroscópico de la invasión de la mucosa del colon por Entamoeba histolytica en cultivo axénico. *Arch Invest Med* 9: 275-284.
- Trissl D, Martínez-Palomo A, de la Torre M, de la Hoz R, Pérez de Suárez E. 1978. Surface properties of Entamoeba: increased rates of human erythrocytes phagocytosis in pathogenic strains. *J Exp Med* 148: 1137-1145.
- Umbreit J, Roseman S. 1975. A requirement for reversible binding between aggregating embryonic cells before stable adhesion. *J Biol Chem* 250: 9360-9368.
- van Houte J. 1983. Bacterial adherence in the mouth. *Rev Infect Dis* 5: S659-S669.
- Virji M, Heckels JE. 1984. The role of common type-specific pilus antigenic domains in adhesion and virulence of gonococci for human epithelial cells. *J Gen Microbiol* 130: 1089-1095.
- Watkins WM. 1966. Blood-Group substances. *Science* 152: 172-181.

- Weerkamp AH, Jacobs T. 1982. Cell wall-associated protein antigens of Streptococcus salivarius: purification, properties, and function in adherence. *Infect Immun* 38: 233-242.
- Werries E, Nebinger P, Franz A. 1983. Degradation of oligosaccharides by β -N-acetylglucosaminidase secreted by Entamoeba histolytica. *Mol Biochem Parasitol* 7: 127-140.
- Williams PH, Sedwick MI, Evans N, Turner PJ, George RH, McNeish AS. 1978. Adherence of an enteropathogenic strain of Escherichia coli to human intestinal mucosa is mediated by a colicinogenic conjugative plasmid. *Infect Immun* 22: 393-402.
- Wyler DJ, Suzuki K. 1983. In vitro parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: effect of enzyme treatments on attachment. *Infect Immun* 42: 356-361.
- Yancey RJ, Willis DL, Berry LJ. 1979. Flagella-induced immunity against experimental cholera in adult rabbits. *Infect Immun* 25: 220-228.
- Zilberberg A, Goldhar J, Ofek I. 1983. Adherence of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) strains to mouse intestine segments analyzed by Langmuir adherence isotherms. *FEMS Microbiology Letters* 16: 225-228.