



Universidad Nacional Autónoma de México

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
I Z T A C A L A**

**"MUTANTES EN PROPIEDADES DE SUPERFICIE: UNA HERRAMIENTA
PARA EL ESTUDIO DE LA VIRULENCIA DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS"**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a

MARIO ALBERTO RODRIGUEZ RODRIGUEZ

México, D. F.

1985

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la dirección de la Dra. Ma.

Esther Orozco Orozco.

Esta tesis es parte de el proyecto "Conjugación y transformación genética en E. histolytica" subvencionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A mis padres por su ayuda y
cariño que me impulsaron
para llegar a esta meta.

Con cariño a mis hermanos y
a las familias Pedraza Reséndiz
y Galvan Pedraza.

INDICE

Lista de Figuras	iv
Lista de Tablas	v
Abreviaturas	vii
Agradecimientos	x
<u>Resumen</u>	1
<u>Introducción</u>	4
<u>Materiales y Métodos.</u>	
Cultivo de Trofozoítos de <u>E. histolytica</u>	30
Cultivo de la línea celular MDCK	31
Cultivo de células de la línea CHO	31
Caracterización preliminar de las mutantes de	
<u>E. histolytica</u> resistentes a emetina	32
Mutagénesis	34
Aislamiento de trofozoítos deficientes en	
fagocitosis	35
Eritrofagocitosis	39
Adhesión a eritrocitos	41
Virulencia	41
"Actividad tóxica" de extractos amibianos	42
Efecto citopático sobre células epiteliales	
en cultivo	44

Interacción de los trofozoítos con células	
de la línea CHO	45
Adhesión a células de la línea CHO	46
Interacción PMN's-amibas	47
Actividad de lectina	48
<u>Resultados</u> .	
Caracterización preliminar de las mutantes Emt ^R	50
Eritrofagocitosis, Adhesión y Virulencia de	
las clonas C ₂ y C ₉	53
Selección de mutantes Fag ⁻ a partir de la clona C ₉ ..	60
Clonación	64
Eritrofagocitosis	66
Adhesión a eritrocitos	68
Virulencia	69
"Actividad de toxina" de los extractos amibianos	71
Efecto citopático sobre células epiteliales	
en cultivo	73
Interacción de los trofozoítos Vir ⁻ con células	
de la línea CHO	75
Adhesión a células de la línea CHO	79
Interacción entre polimorfonucleares y	
<u>E. histolytica</u>	81

Actividad de lectina	83
<u>Discusión</u>	85
<u>Conclusiones</u>	101
<u>Referencias</u>	104

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Prueba de resistencia cruzada para la clona A.
- Figura 2. Prueba de resistencia cruzada para la clona C₂.
- Figura 3. Prueba de resistencia cruzada para la clona C₉.
- Figura 4. Eritrofagocitosis de las clonas A, C₂ y C₉.
- Figura 5. Adhesión a eritrocitos de las clonas A, C₂ y C₉.
- Figura 6. Crecimiento de las subpoblaciones después del segundo tratamiento de selección.

LISTA DE TABLAS

- Tabla I. Prueba de resistencia cruzada para las clonas Emt^R.
- Tabla II. Virulencia de las clonas C₂ y C₉.
- Tabla III. Eficiencia de formación de colonias de las subpoblaciones C₉EMS-2X.
- Tabla IV. Eritrofaagocitosis de las clonas aisladas.
- Tabla V. Adhesión a eritrocitos de las mutantes Fag⁻.
- Tabla VI. Virulencia de las mutantes Fag⁻.
- Tabla VII. Efecto citotóxico de los extractos amibianos de las mutantes Fag⁻, Vir⁻.
- Tabla VIII. Efecto citopático de las mutantes Fag⁻, Vir⁻ sobre células epiteliales en cultivo.

- Tabla IX. Interacción de trofozoítos Vir^- con células de la línea CHO.
- Tabla X. Adhesión de trofozoítos Vir^- a células de la línea CHO.
- Tabla XI. Interacción entre polimorfonucleares y E. histolytica.
- Tabla XII. Actividad de lectina de mutantes Vir^- .
- Tabla XIII. Agrupación de las mutantes de acuerdo a sus fenotipos.

ABREVIATURAS

Adh ⁻	Amibas deficientes en adhesión.
Adh ⁺	Amibas silvestres en adhesión.
Ag ⁻	Amibas deficientes para crecer en agar semi-sólido.
BUdR	5-Bromo-2-deoxiuridina.
CHO	Chinese Hamster Ovary (línea celular aislada de ovario de hámster).
Col ^R	Amibas resistentes a colchicina.
Col ^S	Amibas sensibles a colchicina.
CR 34 Thy ⁻	Cepa bacteriana deficiente para sintetizar timidina.
Ctp ⁻	Amibas deficientes para producir efecto citopático sobre células epiteliales en cultivo.

Ctp ⁺	Amibas silvestres para producir efecto citopático sobre células epiteliales en cultivo.
DNA	Acido desoxirribonucléico.
EFC	Eficiencia de Formación de Colonias.
EFC _R	Eficiencia Relativa de Formación de Colonias.
EMS	Etil Metano Sulfonato.
Emt ^R	Amibas resistentes a emetina.
Fag ⁻	Amibas deficientes en fagocitosis.
Fag ⁺	Amibas silvestres en fagocitosis.
HBSS	Solución salina de Henle balanceada.
MDCK	Madin Darby Cell Kidney (línea celular aislada de riñón de perro).

MM	Medio Mínimo.
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos.
PMN's	polimorfonucleares humanos.
Tox ⁻	Amibas deficientes en "actividad de toxina".
Tox ⁺	Amibas silvestres en "actividad de toxina".
TYI-S-33	Medio para amibas de Diamond y col (1978).
Vir ⁻	Amibas deficientes en virulencia.
Vir ⁺	Amibas silvestres en virulencia.
56/2	Medio de crecimiento para bacterias.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Esther Orozco por la dirección y colaboración en la realización de esta tesis y por todo el apoyo que me ha brindado.

Al M. en C. Fidel de la Cruz Hernández por su colaboración en el presente trabajo.

Al Dr. Jonathan I. Ravdin por sus comentarios y asesoría en los experimentos de interacción con células CHO y PMN's.

Al Q.B.P. Tomás Sánchez por su ayuda en los experimentos de virulencia.

A todos los integrantes del laboratorio 8 de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV por la ayuda prestada para la elaboración del trabajo experimental.

A la Srita. Ma. de Lourdes Vázquez por su amable colaboración en la transcripción de este trabajo.

RESUMEN

El objetivo general de este trabajo fué estudiar la relación que existe entre la virulencia amibiana y algunas propiedades biológicas de los trofozoítos que de acuerdo a los reportes de la literatura correlacionan con ésta. Para la realización de este objetivo se aislaron mutantes amibianas deficientes en fagocitosis y marcadas genéticamente con resistencia a emetina.

De las mutantes de E. histolytica resistentes a emetina aisladas por Orozco y col (1985) se encontraron dos grupos de mutantes con alteraciones a diferente nivel. Un grupo presentó alteraciones a nivel de la membrana plasmática y que además mostró ser deficiente en adhesión, fagocitosis y virulencia. El otro grupo probablemente tiene alteraciones a nivel de la maquinaria de síntesis de proteínas y mostró ser eficiente en adhesión, fagocitosis y virulencia, por lo que se partió de una de estas mutantes para aislar clones deficientes en fagocitosis (Fag⁻).

La selección de las mutantes Fag⁻ se realizó por envenenamiento de los trofozoitos muy fagocíticos con bacterias E coli cepa CR34 Thy⁻ crecidas en medio suplementado con 5-Bromodeoxiuridina (BUDR) e irradiación con luz de 310 nm de longitud de onda. A partir de la clona C₃ mutagenizada con etil metano sulfonato se lograron aislar 10 mutantes independientes deficientes en fagocitosis (Fag⁻). La mayoría de las poblaciones aisladas tuvieron una eficiencia de formación de colonias similar a la que mostró la clona silvestre. Todas las mutantes fueron también deficientes para producir abscesos hepáticos en hámsters jóvenes (Vir⁻) y destruyeron en menor grado monocapas celulares (Ctp⁻) en comparación con la clona silvestre. De las 10 mutantes sólo 3 fueron deficientes en adherir eritrocitos humanos (Adh⁻) y la "actividad de toxina" de los extractos amibianos sobre monocapas epiteliales estuvo afectada en otras 3 mutantes.

Algunas de las mutantes se caracterizaron además en su interacción con células de la línea CHO y con PMN's y en su actividad de lectina inhibible por N-acetil-

D-galactosamina. Las mutantes probadas mostraron tener poco efecto sobre la viabilidad de las células CHO y además fueron más fácilmente destruidas por los PMN's que la cepa virulenta HMI:IMSS. Sin embargo, dos de las mutantes tuvieron un efecto similar al que mostró la cepa HMI:IMSS. La actividad de los extractos amibianos para aglutinar células de la línea CHO (actividad de lectina) sólo estuvo afectada en una de las mutantes, la cual es deficiente para adherir tanto eritrocitos humanos como células de la línea CHO. Las mutantes que mostraron ser eficientes en actividad de lectina mostraron ser también eficientes para adherir eritrocitos pero deficientes para adherir células CHO. Por lo tanto se sugiere que la actividad de lectina esta en relación con la adhesión a eritrocitos humanos, pero como ésta, la lectina no es un factor suficiente para que se exprese la virulencia de este parásito. Además se sugiere la existencia de más de una molécula responsable de la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco.

INTRODUCCION

La amibiasis, una enfermedad entérica que puede extenderse a diversos órganos, es causada por Entamoeba histolytica (Schaudinn, 1903) la cual pertenece al subphylum sarcodina, superclase ribizopoda, clase lobo-sea, orden amoebida, familia entamoebidae (Levine y col, 1980).

E. histolytica puede existir como una amiba vegetativa, fase trofozoítica o como quiste. El trofozoíto es una célula amorfa altamente dinámica, extremadamente sensible a cambios medioambientales, tales como, temperatura, variaciones en el pH, osmolaridad y potencial redox. El trofozoíto mide de 7 a 40 μm y en general es de forma elongada con lobopodos y uroide. El citoplasma está bien diferenciado en ectoplasma hialino y endoplasma granuloso y cuando la amiba procede de un hospedero, presenta además vacuolas con eritrocitos, leucocitos, bacterias, etc. (Martínez-Palomo, 1982). En este organismo hay ausencia de algunos organelos típicos de células eucariontes como son mitocondrias, aparato de Golgi, retículo

endoplásmico rugoso y peroxisomas (Martínez-Palomo, 1982).

Los trofozoítos contienen uno o dos núcleos que miden de 3 a 5 μm de diámetro con cromatina fina preriférica y nucleolo central.

Los quistes de E. histolytica tienen 12 μm de diámetro de promedio y dependiendo de su madurez contienen de uno a cuatro núcleos, los cuales presentan la misma morfología que el núcleo de los trofozoítos (Smith y col, 1979). Como en otros miembros del orden amoebidae, los quistes jóvenes de E. histolytica contienen cuerpos cromatoides, los cuales parecen ser masas de ribosomas (Svhlá, 1961).

El ciclo de vida de Entamoeba histolytica empieza con el quiste como forma infectiva, éste puede sobrevivir fuera del huésped por semanas o meses (Noble y Noble, 1976) y no es destruido por el calor ni por la sequía. La ingestión de quistes a partir de fuentes contaminadas es seguida por la exquistación en el

aparato digestivo. El núcleo, entonces, se divide para formar ocho núcleos (estado metaquistico), sigue una división citoplásmica y emergen de él ocho trofozoítos (Martínez-Palomo, 1982). Posteriormente, los trofozoítos se dividen y se adhieren a la mucosa intestinal y producen ulceración en la mucosa, si se presenta diarrea, algunas amibas son expulsadas del tracto digestivo. Los trofozoítos se dividen una o varias veces y después se enquistan en el mismo huésped. La enquistación es un proceso activo, una vez iniciado, el organismo sufre dos divisiones nucleares para formar un total de cuatro núcleos, durante estas divisiones ocurre glucólisis anaerobia y síntesis de DNA (Barker y Swales, 1971). Una vez formados los quistes se cree que éstos no pueden pasar a la fase trofozoítica en el mismo huésped, sino que tienen que ser expulsados con las heces para empezar un nuevo ciclo (Martínez-Palomo, 1982). Los individuos infectados excretan cerca de 45 millones de quistes por día (Barker y Swales, 1971).

La amibiasis intestinal puede ocurrir en dos formas: (a) Amibiasis aguda o disentería amibiana,

caracterizada por una intensa diarrea y (b) Amibiasis crónica o latente, caracterizada por varios disturbios intestinales, dolores musculares, pérdida de peso, etc. La amibiasis aguda es uno de los mayores problemas de salud en varias regiones del mundo donde las condiciones sanitarias inadecuadas, junto con la pobreza, ignorancia y presencia de cepas amibianas altamente virulentas se combinan para dar una alta incidencia de amibiasis intestinal en niños y de abscesos hepáticos en adultos frecuentemente hombres (Martínez-Palomo, 1982). México es uno de los países en el mundo en el que la amibiasis se presenta con mayor incidencia, ya que se extiende a todo lo largo y ancho de la República (Sepúlveda, 1975). En un estudio sobre mortalidad urbana producida por este parásito llevada a cabo en los años 1962-1964 por la oficina Sanitaria Panamericana en 10 ciudades de Hispanoamérica se encontró que de 100 muertes debidas a la amibiasis 33 ocurrieron en la ciudad de México, lo que quiere decir que de cada 3 individuos que mueren de amibiasis en Hispanoamérica, uno es mexicano y vive en la ciudad de México (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970).

Además de que la amibiasis es una enfermedad grave, capaz de matar al enfermo que la sufre en un período relativamente breve, es también un padecimiento crónico que puede inutilizar a individuos productivos por períodos prolongados con la consecuente repercusión económica (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970).

Varias teorías han sido postuladas con respecto a las características específicas del parásito que pueden ser responsables de su virulencia, estas incluyen:

A) Adhesión.

Generalmente se acepta que la adhesión de los microorganismos a las células epiteliales es un evento crucial para la colonización e invasión de los tejidos. Sin embargo, la adhesión no es una propiedad exclusiva de los microorganismos patógenos.

Como en otros parásitos patógenos entéricos, se puede esperar que un evento crítico en la patogénesis de la amibiasis sea la adhesión de las amibas a la

superficie celular. Este evento puede ser especialmente importante en un proceso invasivo que parece involucrar una destrucción celular dependiente de contacto (Ravdin y col, 1980).

La importancia de la adhesión amibiana ha sido morfológicamente enfatizada con estudios tanto in vivo como in vitro. Takeuchi y Phillips (1975) notaron que la adhesión de las amibas al epitelio colónico es un paso preliminar a su penetración al epitelio interglanular, lo que fue confirmado más tarde por Mora-Galindo y col (1978) quienes hicieron un estudio in vitro utilizando fragmentos de epitelio intestinal de cobayo. García-Rivera y col (1982) aislaron clonas de E. histolytica deficientes en adhesión a eritrocitos humanos, las cuales tuvieron un grado de virulencia menor al mostrado por la clona silvestre, que era eficiente en adhesión.

Las amibas parecen tener mayor afinidad para adherir eritrocitos humanos y de hámster que por eritrocitos

de conejo, cuyo, rata (Olguín, 1984) vaca o borrego (Ravdin y col, 1981), esto sugiere la presencia de receptores específicos en la superficie amibiana que median la adhesión a la célula blanco. Kobiler y Mirelman (1980) aislaron una lectina hemaglutinante de E. histolytica la cual fue sensible a la inhibición por quitotriosa, el trisacarido de N-Acetil-Glucosamina. Esta lectina amibiana está asociada a membrana y es activa a pH de 5.7 a 6, es termolábil, pierde actividad a 37°C después de 2 horas, no es específica de grupo sanguíneo, es inhibida por IgG y es encontrada en igual cantidad en cepas amibianas de diferente virulencia. Orozco y col (1982) demostraron que la inhibición específica de esta actividad de lectina resultaba en inhibición de la adhesión.

Ravdin y Guerrant (1981) han mostrado que E. histolytica se adhiere a células de ovario de hámster chino (CHO), esta adhesión es bloqueada por citoçalasin, lo cual sugiere que para la adhesión amibiana se necesita la participación de los microfilamentos. Estos mismos autores encontraron que la adhesión a células

CHO y a eritrocitos humanos es inhibida específicamente por concentraciones milimolares de N-Acetil-D-Galactosamina (Ravdin y Guerrant, 1981). Además encontraron una relación directa entre el grado de sensibilidad a la inhibición de la adhesión por este azúcar con el grado de la virulencia medida in vitro (Ravdin y col, 1985).

E. histolytica no sólo se adhiere a eritrocitos y a células epiteliales sino que también se adhiere a bacterias. Bracha y col (1982) identificaron dos posibles mecanismos para la unión de bacterias a los trofozoítos de E. histolytica. Ciertas bacterias tales como Escherichia coli y Serratia marcescens, las cuales contienen manosa en su superficie celular, son unidas por receptores de manosa a la membrana amibiana. Otras especies tales como Shigella flexneri y Staphylococcus aureus, los cuales no poseen manosa en su superficie, se unen a la amiba únicamente si se recubren con concanavalina A o después de su opsonización con suero inmune. Esta unión fue marcadamente inhibida por N-Acetil-Glucosamina y por N-Acetil-Galactosamina. Estos resultados indican que las amibas pueden unir e ingerir bacterias

Falta página

N° 12

cepas virulentas estudiadas fueron aglutinadas a bajas concentraciones de esta lectina, mientras que varias cepas no patógenas no aglutinaron. Así parecía que la extrema sensibilidad de aglutinar con Concanavalina A se encontraba en cepas altamente virulentas. Sin embargo, Orozco (1981) realizó el mismo estudio en tres cepas de diferente virulencia y no encontró diferencia en la capacidad de los trofozoitos de cepas de diferente virulencia para aglutinar con Concanavalina A. Por lo tanto, aunque la capacidad de aglutinar con Concanavalina A parecía ser exclusivo de las cepas patógenas, no existe correlación entre esta propiedad y la virulencia de las cepas.

C) Carga eléctrica de superficie.

Trissl y col (1977) midieron la carga eléctrica de superficie de cepas amibianas patógenas y no patógenas y encontraron que las cepas no patógenas mostraron una carga eléctrica de superficie negativa mientras que las cepas patógenas tuvieron una carga eléctrica de superficie tan baja que no pudo ser medida bajo sus

condiciones experimentales. Este es un resultado muy interesante ya que la ausencia de fuerzas repulsivas pueden facilitar la unión a la célula blanco.

D) Eficiencia para formar colonias en agar semisólido.

Gillin y Diamond (1978) reportaron que la capacidad de los trofozoítos para crecer en medio semisólido presenta relación con la virulencia de las cepas amebianas, ya que al analizar la eficiencia de formación de colonias (EFC) de diferentes cepas encontraron que 11 cepas virulentas son capaces de formar colonias en agar semisólido, mientras que las cepas consideradas avirulentas forman muy pocas colonias después de una prolongada incubación en el agar. Por otra parte Orozco y col (1982) encontraron que la clona L-6, deficiente en fagocitosis y en virulencia, presentaba deficiencia para formar colonias en agar semisólido. Sin embargo, revertantes en virulencia de esta clona no recobraron la capacidad de crecer en agar semisólido (Orozco y col, 1983). Además Suárez (1983) aisló clonas deficientes en fagocitosis y en virulencia, las

cuales son capaces de crecer en agar semisólido, aunque la eficiencia de formación de colonias de la cepa silvestre (HM1:IMSS) fue mayor que la de las subpoblaciones deficientes en fagocitosis. Por lo tanto, no se puede afirmar que la disminución en la eficiencia de formación de colonias en agar semisólido esté relacionado con la virulencia.

E) Efecto citopático sobre células en cultivo.

Para evaluar con mayor facilidad el grado de virulencia de las diferentes cepas amebianas, in vitro se han desarrollado varios sistemas utilizando monocapas de células de mamífero en cultivo midiendo el grado de destrucción de la monocapa después de la interacción con las amebas. El grado de destrucción de la monocapa parece correlacionar directamente con el grado de virulencia. Mattern y col, (1978) probaron el efecto citopático de 12 cepas de diferente virulencia sobre células de ratón de la línea 3T3 y sobre células de hámster de la línea BHK y encontraron tres grados diferentes de destrucción de la monocapa que correspondían con los

tres grados de virulencia mostrada por las diferentes cepas utilizadas. Orozco y col (1980) midieron el efecto citopático de tres cepas de diferente virulencia sobre monocapas de células epiteliales de la línea MDCK, encontrando también una correlación directa entre el efecto citopático sobre las monocapas y la virulencia de las cepas. Otros tipos de líneas celulares también han sido utilizadas para medir la virulencia de las cepas amebianas in vitro, por ejemplo Ravdin y col (1980) utilizaron células de ovario de hámster chino (CHO), Knight (1977) utilizó células de riñón de conejo.

F) Fagocitosis.

Desde que Lösh descubrió la naturaleza hematófaga de E. histolytica la ingestión de eritrocitos humanos por parte de los trofozoítos es uno de los criterios biológicos para reconocer a las amebas patógenas en las lesiones que se producen en el organismo humano. Además la eritrofagocitosis ha sido considerada tradicionalmente como uno de los criterios más importantes para identificar los trofozoítos de E. histolytica en heces.

Chévez y col (1974) fueron los primeros en postular la relación de la fagocitosis con la patogenicidad del organismo. Trissl y col (1978) midieron el grado de eritrofagocitosis de cepas de E. histolytica patógenas y no patógenas, estos estudios mostraron que las cepas patógenas tienen una ingestión de eritrocitos superior a las cepas no patógenas. Orozco y col (1980) compararon el grado de fagocitosis de tres cepas de diferente virulencia y encontraron una relación directa entre el grado de eritrofagocitosis y el grado de virulencia.

La prueba más directa de esta relación fue el aislamiento de clonas deficientes en fagocitosis, las cuales son también deficientes en virulencia (Orozco y col, 1982, 1983; Suárez, 1983). Orozco y col (1983) obtuvieron revertantes en virulencia a partir de una clona deficiente en fagocitosis y en virulencia (L-6), cuando los trofozoítos revirtieron en virulencia mostraron un aumento en su grado de fagocitosis. Sin embargo Ravdin y col (1980) encontraron que E. histolytica ejerce su efecto citoletal sobre células de

la línea CHO de manera extracelular y dependiente de contacto, ya que estos autores detectaron un gran número de células CHO muertas antes de su ingestión.

G) "Actividad citotóxica" de extractos amibianos.

Lushbaugh y col (1978) reportaron el efecto citopático de extractos libres de células de dos cepas de E. histolytica de diferente virulencia sobre monocapas de células de las líneas HeLa y BHK-21, este efecto citotóxico fue sensible a suero y se necesitó una menor concentración de proteína de los extractos de la cepa más virulenta para la destrucción de la monocapa. Bos y col (1980) demostraron que la actividad de toxina está presente en una fracción con un peso molecular entre 35000 y 45000 daltones, la toxina es estable entre un pH de 4 a 10, es degradable por tripsina y parece ser una glicoproteína ya que es capaz de unirse a concanavalina A. Mattern y col (1980) encontraron que el efecto citotóxico es bloqueado por fetuina y N-Acetil-Galactosamina, lo que sugiere que la toxina amibiana tiene propiedades del tipo de las

lectinas.

H) Actividad mitogénica de extractos amibianos sobre linfocitos humanos.

Como se menciona anteriormente la virulencia amibiana se ha correlacionado con la actividad de lectina inhibible de N-Acetil-D-Galactosamina. Por otra parte se ha demostrado que las lectinas tienen actividad mitogénica. Por lo tanto, se puede pensar que la actividad mitogénica también puede correlacionar con la virulencia de este parásito. De hecho Diamantstein y col (1981) demostraron que extractos amibianos de la cepa HK-9 inducen la proliferación de linfocitos T en individuos normales, en cambio los linfocitos E no parecen proliferar en presencia de estos extractos. Kettis y Sundqvist (1982) confirmaron que extractos de las cepas HK-9 y NIH:200 presentan actividad mitogénica sobre linfocitos T. Salata y Ravdin (1985) encontraron que la actividad mitogénica de extractos de la cepa HM1:IMSS estaba asociada con la actividad de lectina inhibible por N-Acetil-D-Galactosamina descrita

por Ravdin y col (1981). Esta actividad es inhibida significativamente por asialofetuina, molécula que contiene tres residuos terminales de N-Acetil-D-Galactosamina, además encontraron que la actividad mitoquénica correlaciona con la virulencia medida in vitro de cuatro diferentes cepas (Salata y Ravdin, 1985).

I) Actividad de colagenasa.

Muñoz y col (1982) analizaron la actividad de colagenasa de E. histolytica y encontraron que este parásito presenta una enzima con una especificidad por la colágena tipo I superior a la que presenta por las colágenas tipo II y III. Esta colagenasa es inhibida por suero, por EDTA y por L-cisteína, pero no es afectada por los inhibidores de proteasas parametil sulfonil cloruro, N-Etil maleimida o inhibidores de tripsina de frijol de soya. Aparentemente la colagenasa amibiana se encuentra localizada en la membrana plasmática de la amiba y es necesario un contacto directo con el sustrato para la digestión de la colágena. Además Muñoz y col (1984) encontraron que la

cepa HMI:IMSS, altamente virulenta, tiene una actividad de colagenasa cuatro veces mayor que la presentada por la cepa HK-9, la cual es menos virulenta.

J) Efecto de "porameba".

Young y col (1982) describieron una proteína asociada a la membrana de E. histolytica que es capaz de formar poros en la membrana plasmática de macrófagos y linfocitos ya que en presencia de esta fracción membranal amibiana hay una rápida despolarización en la membrana de las células mencionadas. Estos cambios en permeabilidad iónica también son producidos en bicapas lipídicas. Esta proteína formadora de poros es afectada por pronasa, tripsina y por la temperatura. Los canales formados por esta proteína son cuatro veces más permeables a cationes monovalentes que a aniones. La secreción de esta proteína es estimulada después de la exposición al ionóforo de calcio A23187, concanavalina A y lipopolisacáridos de Escherichia coli.

Lynch y col (1982) también reportaron un polipéptido

(amebaporo) que está presente en el medio de cultivo y en una fracción de la ameba que sedimenta a alta velocidad (150,000 x g). Este "amebaporo" que probablemente es el mismo que describieron Young y col (1982) se incorpora espontáneamente en bicapas lipídicas, en liposomas y en células produciendo un progresivo e irreversible cambio en la conductancia iónica de las membranas de las células blanco. El "amebaporo" es insoluble en triton X-100, pero puede ser disociado en un estado activo en SDS al 1%, bajo estas condiciones tiene un peso molecular aparente de 13,000 daltones. Además, este factor de porameba está presente en mayor cantidad en la cepa virulenta HMI:IMSS que en la cepa no virulenta HK-9.

Así, la virulencia de E. histolytica se ha correlacionado con algunas propiedades de los trofozoítos como la aglutinación con concanavalina A (Trissl y col, 1977), la carga eléctrica de superficie (Trissl y col, 1977), la fagocitosis (Trissl y col, 1978; Orozco y col, 1982, 1983; Suárez, 1983), la eficiencia para formar colonias en agar semisólido (Gillin y Diamond, 1978)

y el efecto citopático sobre células en cultivo (Mattern y col, 1978; Orozco y col, 1980). También se ha correlacionado con algunas actividades biológicas como efecto citotóxico de los extractos amibianos sobre células en cultivo (Lushbaugh y col, 1978; Bos y col, 1980; Mattern y col, 1980), el efecto de porameba (Young y col, 1982; Lynch y col, 1982), actividad mitogénica de los extractos amibianos sobre linfocitos humanos (Diamantstein y col, 1981; Salata y Ravdin, 1984), la presencia de actividad de lectina sobre eritrocitos humanos (Kobiler y Mirelman, 1980) y sobre células de la línea CHO (Ravdin y col, 1984) y con actividades enzimáticas como la de colagenasa (Muñoz y col, 1984). Sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible definir con claridad si estos fenómenos tienen un papel importante en la virulencia o si se trata de fenómenos, que aunque puedan estar ligados a factores involucrados en la virulencia, no tengan relación directa con ella. Una manera para saber cuales de estos factores están realmente involucrados en la virulencia amibiana es utilizar un enfoque genético, aislando mutantes deficientes en propiedades que se ha reportado que

correlacionan con la virulencia.

Los estudios en parásitos hasta hace poco tiempo habían sido enfocados principalmente a descripciones morfológicas y ecológicas. Sin embargo, en la actualidad poco es conocido acerca de la genética de muchos parásitos, la falta de progreso en este campo se ha debido a: (a) las dificultades para aplicar las técnicas convencionales de análisis genéticos en organismos con ciclos de vida complejos, (b) a la falta de caracteres reconocibles que puedan servir como marcadores genéticos y (c) a la falta de métodos adecuados de cultivo para muchos parásitos. Para protozoarios parásitos estos estudios ya se han llevado a cabo en algunos organismos que presentan una fase sexual conocida en su ciclo de vida, principalmente en malaria y coccidia. Por ejemplo, en los géneros Eimeria y Toxoplasma se ha demostrado que puede ocurrir recombinación genética mediante el uso de marcadores genéticos de resistencia a drogas (Joyner y Norton, 1975; Pfefferkorn y Pfefferkorn, 1980). En Trypanosoma se han utilizado técnicas de genética molecular con las cuales se han identificado

cuatro antígenos de superficie (Hoeijmakers y col, 1980). Los estudios genéticos en malaria han dado información principalmente en las siguientes áreas:

- 1) La organización genética básica del parásito (Beale y col, 1978).
- 2) La extensa variación genética de enzimas en poblaciones normales del parásito (Carter, 1978).
- 3) La genética de resistencia a drogas antimalariales (Rosario, 1976; Padua, 1981).
- 4) Genética de la virulencia, donde al cruzar líneas virulentas con líneas avirulentas se definió que la virulencia es un carácter típicamente mendeliano (Walliker y col, 1976).

Así, tanto la genética convencional como la genética molecular han dado importante información acerca de la biología básica de protozoarios parásitos. Por lo tanto, una forma de definir cuáles son los factores

realmente involucrados en la virulencia amibiana es utilizar un enfoque genético como el aislamiento de mutantes deficientes en características amibianas involucradas en la virulencia. De hecho Orozco y col (1983) y Suárez (1983) reportaron el aislamiento de clonas amibianas deficientes en fagocitosis a partir de la cepa HM1:IMSS, en estos trabajos se demostró que las clonas deficientes en fagocitosis presentan deficiencia en virulencia. Sin embargo, estas clonas fueron aisladas de una cepa muy heterogénea (Orozco y col, 1985) y sin mutagenizar, por lo que se podría pensar que estas amibas son variedades poco virulentas de E. histolytica y por lo tanto, es difícil establecer la separación clara entre la virulencia y otros fenómenos diferentes a los tomados en cuenta para su aislamiento.

Por otra parte, no existen hasta la fecha marcadores en E. histolytica que permitan seguir experimentalmente a las amibas cuando se obtienen mutantes deficientes en fenómenos biológicos implicados en la virulencia, ni al revertir la deficiencia. Esto sería de gran utilidad en el estudio de la genética de la virulencia

amibiana.

La emetina podría ser una de las drogas de elección para marcar genéticamente a E. histolytica, obteniendo mutantes amibianas resistentes a ella. Estudios hechos por Grollman (1966) indican que esta droga es un potente agente selectivo en células eucariontes, además de ser un potente inhibidor de la síntesis de proteínas. Orozco y col (1985) han obtenido mutantes amibianas resistentes a emetina que pueden servirnos para partir de ellas y obtener mutantes amibianas deficientes en virulencia y marcadas genéticamente con resistencia a esta droga.

De esta manera como objetivo general de esta tesis nos propusimos obtener mutantes de E. histolytica deficientes en virulencia y marcadas genéticamente con resistencia a emetina para analizar en estas mutantes algunas de las propiedades y actividades biológicas que se han correlacionado con la virulencia de este parásito, con el fin de determinar cuáles de estos fenómenos están directamente involucrados en la virulencia amibiana.

OBJETIVOS

En el presente trabajo nos propusimos los siguientes objetivos particulares:

- 1) Caracterizar preliminarmente a mutantes de E. histolytica resistentes a emetina.
- 2) Obtener mutantes de E. histolytica deficientes en fagocitosis y marcadas genéticamente con resistencia a emetina.
- 3) Obtener mutantes de E. histolytica deficientes en adhesión y marcadas genéticamente con resistencia a emetina.
- 4) Caracterizar la virulencia de las mutantes obtenidas.
- 5) Caracterizar las mutantes deficientes en virulencia en algunas de las propiedades que se han relacionado con la virulencia ambiental como son el efecto

citopático sobre células en cultivo, la "actividad de toxina", la actividad de lectina inhibible por N-Acetil-D-Galactosamina, interacción con células de la línea CHO, la interacción con Polimorfonucleares humanos, la capacidad de formar colonias en agar semisólido.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de trofozoítos de Entamoeba histolytica.

Todas las clones utilizadas en el presente trabajo fueron cultivadas axénicamente a 37°C en tubos de 16 x 125 mm con medio TYI-S-33 (Diamond y col, 1970) suplementado con 20% de suero bovino, 3% de la mezcla de vitaminas de Diamond (Special Diamond Vitamin Mixture, North American Biologicals) y antibióticos (penicilina 0.25 UI/ml y estreptomicina 35 µg/ml). A excepción de la clona A, los trofozoítos se cultivaron en presencia de 12 µg/ml de emetina (Dolder, USA).

Para cosechar o resembrar los trofozoítos, los tubos con los cultivos en fase logarítmica de crecimiento se incubaron en un baño de agua-hielo durante 5 a 10 min para despejar los trofozoítos de las paredes del tubo se acitaron suavemente y se pasaron a medio fresco.

Cultivo de la línea celular MDCK. Las células de la línea celular MDCK fueron cultivadas en medio de Eagle (1959), suplementado con 10% de suero de ternera (Gibco, USA) y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml). Las células se sembraron a altas densidades en botellas de cultivo de 75 cm² (Corning, USA) y en multicámaras Linbro (Linbro, USA). Se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ y aire (5:95%) y se utilizaron entre 3 y 5 días después de la siembra cuando las monocapas presentaron confluencia.

Cultivo de células de la línea CHO. Las células CHO fueron cultivadas en medio F-12 (Grand Island Biologicals Co., N.Y.) con 10% de suero fetal de ternera (Grand Island Biologicals Co.), penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml). Las células se sembraron en botellas de cultivo de 75 cm² (Corning, USA). Cuando los cultivos presentaron confluencia las células fueron colectadas. Para colectar las células se eliminó el medio de cultivo, se agregaron 2 ml de tripsina EDTA 10X (Gibco, USA), la cual se eliminó inmediatamente, se agregaron otros 2 ml de tripsina EDTA y se incubaron a

37°C durante 2 min. Al término de este tiempo se eliminó la tripsina y las células se incubaron durante 10 min a 37°C. Posteriormente las células se colectaron con 5 ml de medio F-12.

Caracterización preliminar de las mutantes de Entamoeba histolytica resistentes a emetina. Previo a la selección de trofozoítos deficientes en fagocitosis (Fag⁻) a partir de clonas amibianas resistentes a emetina (Emt^R) varias clonas Emt^R se sometieron a pruebas de resistencia cruzada a colchicina tanto en medio líquido como en medio semisólido. Al mismo tiempo se probó si las mutantes eran estables, es decir, si seguían conservando la característica de ser resistentes a emetina.

a) Sensibilidad a colchicina en medio líquido.

Cultivos en fase exponencial de crecimiento se incubaron en un baño de agua-hielo para desprejar los trofozoítos de las paredes del tubo y 10^4 trofozoítos fueron pasados a un tubo con 12 µg/ml de emetina o 200 o 400 µg/ml de colchicina (Sigma Chemical, USA), como

Falta página

N° 33

colonias fueron aparentes a simple vista. La eficiencia de formación de colonias se determinó como el número de colonias aparentes a simple vista dividido entre el número de trofozoítos inoculados y multiplicado por 100.

Mutagénesis. Para obtener clones de E. histolytica E_{mt}^R y deficientes en fagocitosis (Fag^-) trofozoítos de la clona C_9 resistente a emetina, muy fagocítica y muy virulenta (E_{mt}^R , Fag^+ , Vir^+) se crecieron en una botella de cultivo de 150 cm^2 (Corning, USA) hasta que las células se encontraron en fase media logarítmica, a este tiempo se agregaron $350\text{ }\mu\text{g/ml}$ de etil metano sulfonato (EMS) durante 24 h, (Hernández, 1985) al término de este tiempo el cultivo se incubó en un baño de agua-hielo para despegar los trofozoítos de las paredes de la caja de cultivo, los trofozoítos se pasaron a tubos cónicos de 50 ml y se centrifugaron a $360 \times g$ durante 5 min, el sobrenadante se descartó, eliminando de esta manera el mutágeno. La pastilla se resuspendió en medio "YI-S-33" y los trofozoítos se distribuyeron en 39 tubos de cultivo independientes los cuales se incubaron a 37°C durante 48 h para permitir la segregación de las mutaciones.

Aislamiento de trofozoítos deficientes en fagocitosis. La técnica utilizada para aislar trofozoítos deficientes en fagocitosis fue la descrita por Orozco y col (1993), la cual consistió en utilizar bacterias Escherichia coli cepa CR34 Thy^- crecidas en medio suplementado con 5-Bromo-2-deoxiuridina (BUdR) (Sigma Chemical, USA) y alimentar con ellas a los trofozoítos. Las amibas que ingirieron suficientes bacterias incorporaron la BUdR en su genoma y al irradiarlos con luz de longitud de onda de 310 nm el DNA amibiano se rompió, muriendo los trofozoítos al momento de replicarse.

a) Preparación de las bacterias.

Escherichia coli cepa CR34 Thy^- fue crecida en medio 56/2 (descrito en el anexo de esta tesis) suplementado con glucosa 0.5%, 5% de casaminoácidos libre de vitaminas (Difco, USA), 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tiamina (Sigma Chemical, USA) y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de timidina (Sigma Chemical, USA). El crecimiento de las bacterias se llevó a cabo a 37°C en agitación. Los cultivos en fase exponencial de crecimiento fueron lavados 3 veces con medio 56/2 para

eliminar los restos de timidina soluble. De la suspensión anterior se inocularon 0.5 ml en medio 56/2 en el cual la timidina se substituyó con 50 µg/ml de BUDP. Una vez que el nuevo cultivo llegó a la fase exponencial de crecimiento, las bacterias se lavaron 3 veces con medio 56/2 y se ajustaron a 30 unidades Klett (1×10^8 bacterias/ml).

b) Interacción trofozoítos-bacterias.

Los trofozoítos tratados con EMS 24 h antes fueron incubados en un baño de agua-hielo para despegarlos de las paredes del tubo, se centrifugaron a $360 \times g$ y se lavaron una vez con medio mínimo (MM) (Gillin y Diamond, 1980) y se resuspendieron en MM a 1×10^6 trofozoítos/ml. Posteriormente 1 ml de la suspensión de trofozoítos se pasó a tubos estériles y se le agregó 1 ml de la suspensión de bacterias (1×10^8 /ml). Las mezclas celulares se incubaron a 37°C durante 3 h para permitir que las amibas ingirieran a las bacterias. Después de este tiempo las amibas se lavaron con MM para eliminar las bacterias no ingeridas y 0.5×10^6 trofozoítos se inocularon en tubos con medio TYI-S-33. Los trofozoítos

que estuvieron en contacto con las bacterias se incubaron a 37°C durante 24 h para permitir la replicación de las amibas y la incorporación de la BUDR en su DNA.

c) Irradiación.

Los trofozoítos que estuvieron en incubación por 24 h, se centrifugaron a 360 x g, se lavaron 2 veces con M¹ y se resuspendieron a 0.25×10^6 trofozoítos/ml en M¹, 2 ml de esta suspensión se pasaron a cajas de petri de 35 X 10 mm (Lux, Miles Laboratories, USA). Las tapas de las cajas se invirtieron y se llenaron con una solución de timidina (1 mg/ml) la cual actuó como filtro protector de la luz de longitud de onda muy corta (<310 nm). Las cajas de petri se pusieron sobre hielo y bajo una lámpara de luz de 310 nm a una distancia aproximada de 5 cm con el filtro de timidina interpuesto y en agitación suave durante 2 h. Terminado el tratamiento de irradiación los trofozoítos fueron sembrados en tubos con medio TYI-S-33. Los trofozoítos sobrevivientes a la irradiación se contaron con ayuda de un hematómetro a diferentes tiempos hasta que alcanzaron la fase exponencial de

crecimiento. El protocolo completo se realizó 2 veces.

d) Clonación.

A partir de los trofozoítos sobrevivientes al segundo tratamiento de selección se aislaron trofozoítos provenientes de una sola célula mediante la técnica de formación de colonias ya antes descrita (Gillin y Diamond, 1978). El agar se complementó con 6 $\mu\text{g/ml}$ de emetina. Después de 7 a 10 días, cuando las colonias fueron aparentes a simple vista, se extrajo una colonia de cada caja, mediante el uso de pipetas pasteur estériles, que se pasó a tubos con 12 ml de medio TYI-S-33 con 12 $\mu\text{g/ml}$ de emetina.

En el caso de una de las subpoblaciones, la número 8, que fue incapaz de crecer en agar semisólido, la clonación se llevó a cabo en medio líquido inoculando en viales con 5 ml de medio TYI-S-33 un trofozoíto por vial. Los viales se incubaron a 37°C y los trofozoítos de uno de los viales con crecimiento se pasaron a un tubo de 16 X 125 mm para seguir su cultivo en presencia de 12

µg/ml de emetina.

Obtención de eritrocitos humanos. Los eritrocitos fueron obtenidos por punción venosa mediante jeringas estériles con solución de Alsever (Garvey y col, 1977) como anticoagulante. La muestra de sangre se pasó a un tubo de 16 X 125 mm, se centrifugó a $1000 \times g$ durante 10 min para separar los eritrocitos de otros elementos sanguíneos. Posteriormente los eritrocitos se lavaron 3 veces con solución salina (NaCl 0.9%) y se resuspendieron en medio TYI-S-33 a una concentración de 1×10^8 eritrocitos/ml. Para todas las pruebas de fagocitosis y adhesión se utilizaron eritrocitos de no más de 5 días de extraídos.

Eritrofagocitosis. Las pruebas de eritrofagocitosis fueron realizadas de acuerdo a la técnica descrita por Trissl y col (1978). Los tubos de cultivo de las diferentes clonas se incubaron de 5 a 10 min en un baño de agua-hielo para despegar los trofozoítos de las paredes del tubo. Se centrifugaron durante 5 min a $360 \times g$ y se ajustaron en su propio medio a 1×10^6 trofozoítos/ml.

0.4 ml de esta suspensión se pusieron en contacto con 0.4 ml de la suspensión de eritrocitos humanos frescos (1×10^8 eritrocitos/ml). Los tubos con las suspensiones celulares se incubaron en baño María a 37°C durante 5 y 10 min. Al término de cada tiempo se agregaron 10 ml de agua bidestilada para lizar los eritrocitos no ingeridos. Después de 5 min de incubación con agua bidestilada a temperatura ambiente, las preparaciones se centrifugaron a $360 \times g$ durante 5 min, se descartaron los sobrenadantes se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en solución salina amortiguadora de fosfatos, pH 7.3 (PBS) por 30 min a 37°C . Posteriormente, las preparaciones se lavaron 3 veces con solución salina y los eritrocitos ingeridos se contrastaron con la tinción de Novikoff (1972) la cual consiste en incubar las preparaciones durante 30 min a 37°C con 3-3'diaminobencidina (Sigma Chemical, USA). Al término de este tiempo las preparaciones se lavaron 3 veces con solución salina. Posteriormente se contaron los eritrocitos ingeridos en 100 amibas elegidas al azar y se obtuvieron los promedios de eritrocitos ingeridos por cada clona a cada tiempo.

Adhesión a eritrocitos. Para las pruebas de adhesión a eritrocitos se utilizó la técnica descrita por García-Rivera y col (1982). Los trofozoítos de las diferentes clonas fueron incubadas en un baño de agua-hielo durante 5 a 10 min, se centrifugaron a $360 \times g$ durante 5 min y se ajustaron en su propio medio a 1×10^6 trofozoítos/ml. 0.4 ml de esta suspensión se incubaron con 0.4 ml de la suspensión de eritrocitos humanos frescos (1×10^8 eritrocitos/ml). Los tubos con las suspensiones celulares se incubaron en un baño de agua-hielo durante 5 y 10 min. Al término de estos tiempos las preparaciones se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS durante 30 min a 37°C. Posteriormente las preparaciones se lavaron 3 veces con solución salina y los eritrocitos se contrastaron utilizando la tinción de Novikoff (1972). Posteriormente las preparaciones se lavaron 3 veces con solución salina y se contaron los eritrocitos adheridos en 100 amibas elegidas al azar; obteniéndose los promedios de eritrocitos adheridos por amiba para cada clona y a cada tiempo.

Virulencia. La virulencia de las clonas se

determinó por inoculación intraportal de trofozoítos en hámsters jóvenes machos de aproximadamente 100 g de peso que se anestesiaron por vía intraperitoneal con Anestésal (Norden, México) utilizándose 1 ml de una solución diluida 1:10 por cada 100 g de peso del animal. Una vez anestesiados se les practicó laparatomía amplia y se localizó la vena porta, por la cual se inocularon 2.5×10^5 trofozoítos en 0.5 ml de medio TYI-S-33 con una jeringa estéril de 1 ml. La herida se cerró cosiendo en 2 planos, el músculo y la piel. Al término de 8 días los hámsters se anestesiaron con cloroformo, se abrieron para extraer el hígado y localizar la presencia de abscesos así como el tamaño de éstos.

"Actividad tóxica" de extractos amibianos. Para medir la "actividad de toxina" de las diferentes clonas se utilizó la técnica descrita por Lushbaugh y col (1978), Bos (1980) y Mattern y col (1980). Los tubos de cultivo de las diferentes clonas se incubaron en un baño de agua-hielo durante 5 a 10 min, se centrifugaron a $360 \times g$ durante 5 min, los sobrenadantes se descartaron y las pastillas se lavaron 3 veces con solución salina.

Las suspensiones se ajustaron a 1×10^6 trofozoítos/ml en solución salina y los trofozoítos fueron lisados por 2 pasos de congelación-descongelación, se centrifugaron a $910 \times g$ durante 15 min a 4°C se agregó 0.02 de β -mercaptoetanol (Merck-México). Los sobrenadantes se agregaron a monocapas de células epiteliales de la línea MDCK cultivadas en multicámaras Linbro, previamente lavadas con solución salina. Las monocapas con extractos amibianos se incubaron a 37°C durante 1 h. Al término de este tiempo se retiraron los sobrenadantes y se procedió a evaluar el grado de destrucción de la monocapa. Para medir cuantitativamente la destrucción de la monocapa se utilizó la técnica descrita por Orozco y col (1978) y Bracha y Mirelman (1984). Después de lavar la multicámara 3 veces con solución salina, las preparaciones se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS durante 15 min. Al término de este tiempo las preparaciones se lavaron 2 veces con solución salina. Posteriormente se tiñieron con azul de metileno al 1% preparado en solución amortiguadora de boratos 0.1 M pH 8.7 durante 10 min. Las monocapas se lavaron 3 veces con 1 ml de la solución de boratos 0.01 M. Para extraer el

color absorbido por las monocapas se agregó 1 ml de HCl 0.1 M durante 30 min a 37°C. Posteriormente se leyó la absorbancia a 660 nm. El 0% de la destrucción de la monocapa se tomó de los valores registrados para las monocapas celulares que no estuvieron en contacto con los extractos amibianos y como el 100% de la destrucción de la monocapa se tomó el valor registrado para las células que estuvieron en contacto con los extractos de los trofozoítos de la clona C₉.

Efecto citopático sobre células epiteliales en cultivo. Los trofozoítos de las diferentes clonas se separaron de las paredes del tubo por enfriamiento en agua-hielo, se centrifugaron a 360 x g durante 5 min se descartaron los sobrenadantes y los trofozoítos se ajustaron a 1×10^6 trofozoítos/ml en medio TYI-S-33. 0.1 ml de cada suspensión celular se pusieron en contacto con monocapas de células epiteliales de la línea MDCK cultivadas en multicámaras Linbro previamente lavadas con solución salina. Se agregó 1 ml de medio TYI-S-33 a cada pozo de las multicámaras y se incubaron a 37°C durante 1 h. Al término de este tiempo se incubó la

multicámara a 4°C durante 15 min para despegar los trofozoítos de la cámara de cultivo, se desecharon los sobrenadantes, las cámaras se lavaron 3 veces con solución salina fría y se procedió a evaluar el grado de destrucción de la monocapa de la manera antes mencionada.

Interacción de los trofozoítos con células de la línea CHO. Para el ensayo de muerte celular de células de la línea CHO se siguió la técnica descrita por Ravdin y col (1980). Células CHO tripsinizadas se resuspendieron en medio F-12 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal de ternera, se lavaron una vez con medio FYI-S-33 al 1% en PBS y se ajustaron a 2×10^5 células/ml. 1 ml de esta suspensión se pasó a tubos de poliestireno de 12 x 75 mm (Falcon, USA), se agregó a cada tubo 1×10^4 amibas de las diferentes clonas obteniendo una relación de 20 células CHO por cada amiba. Las suspensiones celulares se centrifugaron a $360 \times g$ durante 5 min. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 3 h. Al término de este tiempo se le agregó a cada pastilla celular 0.1 ml de azul de tripano al 4% y se

contó el número de células CHO vivas y muertas con ayuda de un hematímetro.

Adhesión a células de la línea CHO. Los tubos de cultivo con las diferentes clonas se incubaron en un baño de agua-hielo para despejar los trofozoítos de las paredes del tubo, se centrifugaron a $360 \times g$ durante 5 min y se lavaron 2 veces con medio salino F de Puck sin suero, pH 6.8. Posteriormente 1×10^4 amibas de cada clona se pusieron en contacto con 2×10^5 células de la línea CHO. Las suspensiones celulares se resuspendieron en 1 ml de medio salino de Puck, se centrifugaron a $360 \times g$ durante 5 min y se incubaron a $4^{\circ}C$ durante 3 h. Al término de este tiempo, se decantó el medio y las células se resuspendieron suavemente en el tubo y se contaron las amibas que adhirieron células CHO, tomándose como positivas aquellos trofozoítos que adhirieron 3 células o más (formación de roseta).

Obtención de Polimorfonucleares. Los polimorfonucleares (PMN's) se obtuvieron por punción venosa con una jeringa estéril, utilizando heparina como

anticoagulante, la sangre se diluyó 1:1 en solución salina de Henle balanceada 1X (HBSS). 30 ml de la mezcla de sangre se agregaron a un tubo cónico de 50 ml que contenía 12 ml de una solución de ficol-hipaque, la mezcla se centrifugó a $400 \times g$ durante 40 min. Al término de este tiempo se eliminaron las tres capas superiores. Las capas restantes se diluyeron en 8 a 10 ml de dextrán al 3% y esta mezcla se dejó sedimentar durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente se removió la capa superior, la cual contiene los PMN's, y se centrifugó a $360 \times g$ durante 15 min a $4^{\circ}C$. Posteriormente se añadieron en el siguiente orden, 3 ml de NaCl al 0.22% durante 45 min, 0.88 ml de NaCl al 0.3% y 5 ml de HBSS. Posteriormente la suspensión se centrifugó a $360 \times g$ durante 15 min a $4^{\circ}C$. Finalmente los PMN's se resuspendieron a una concentración de 2×10^6 PMN's/ml.

Interacción PMN'S-amibas. Los trofozoítos de las diferentes clonas se ajustaron a 1×10^5 trofozoítos/ml y 0.1 ml de estas suspensiones se pusieron en contacto con 1 ml de una suspensión de PMN's (2×10^6 PMN's/ml). Las suspensiones celulares se centrifugaron a $360 \times g$ durante 5

min y se incubaron a 37°C durante 3 h. Una vez concluido este tiempo se agregó 0.1 ml de azul de tripano al 4% y se contó el número de amibas vivas y muertas así como el número de PMN's vivos y muertos con ayuda de un hematómetro.

Actividad de lectina. Para medir la actividad de lectina inhibible por N-acetil-D-galactosamina se utilizó la técnica descrita por Ravdin y col, (1985). Los trofozoítos de las diferentes clonas se centrifugaron a 360 x g durante 5 min, se lavaron 2 veces con PBS, se resuspendieron en un volumen de 3 ml de PBS y se sonicaron 2 veces durante 30 seg, teniendo las suspensiones en un baño de hielo durante todo el procedimiento. Posteriormente los sonicados se centrifugaron a 250,000 x g durante 30 min. De cada sonicado se midió la cantidad de proteína presente mediante la técnica descrita por Bradford (1976) y se hicieron diferentes diluciones en PBS, las cuales se pusieron en contacto con 2×10^5 células de la línea CHO previamente fijadas con glutaraldehído al 1%. Las células con el sonicado amibiano se colocaron en 3 pozos de microtitulación. Las placas

se incubaron durante 1 h en agitación a 4°C. Al término de este tiempo se observó al microscopio óptico y se dieron valores de 0 a 4 a cada pozo, según la aglutinación que presentaban las células. 0 fue el valor para aquellas células que no aglutinaron y 4 para aquellas células que formaron una pastilla compacta en el centro del pozo. La actividad de lectina se determinó a partir de la mínima concentración del sonicado que produjo aglutinación, se obtuvo un promedio del grado de aglutinación de los 3 pozos con la misma dilución y se dividió entre la cantidad de proteína presente en dicha dilución.

RESULTADOS

Caracterización preliminar de las mutantes Emt^R.

Varios investigadores (Hutchinson, 1963; Bench-Hansen y col, 1976) han reportado que mutantes resistentes a una droga, frecuentemente presentan alteraciones en la membrana, que las hacen resistentes a otras drogas. En este trabajo utilizamos clonas amibianas resistentes a emetina (Orozco y col, 1985) para aislar las mutantes deficientes en fagocitosis. Para descartar que estas mutantes presentaran alteraciones a nivel de la membrana, ya que la membrana plasmática amibiana juega un papel importante en la virulencia, se realizaron pruebas de resistencia cruzada a otra droga. Para estas pruebas se eligió la colchicina, porque Bench-Hansen y col (1976) encontraron que mutantes resistentes a colchicina también eran resistentes a emetina.

Las pruebas de resistencia cruzada se hicieron de dos maneras, una siguiendo el crecimiento celular, contando los trofozoítos viables en medio líquido y en presencia de 12 µg/ml de emetina o 200 o 400 µg/ml de

colchicina, la otra manera fue midiendo la FFC en agar semisólido en presencia de 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de emetina o de 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de colchicina.

La caracterización de 11 clonas Emt^{R} tanto en medio líquido como en medio semisólido se muestra en la Tabla I donde se puede observar que 5 de las clonas probadas mostraron ser inestables, ya que perdieron la característica de ser Emt^{R} después de ser cultivadas durante varias generaciones en ausencia de la droga. De las 6 clonas que siguieron conservando la resistencia a emetina se encontraron 2 grupos diferentes de mutantes, un grupo compuesto de 3 clonas (C_2 , C_3 y C_8) fueron también resistentes a colchicina (Col^{R}), esto sugirió que estas mutantes tienen alteraciones a nivel de la membrana plasmática que hacen disminuir su permeabilidad y por eso son resistentes a las 2 drogas. El otro grupo Emt^{R} , también representado por 3 clonas (C_6 , C_9 y C_{10}) fueron sensibles a colchicina (Col^{S}), lo que sugiere que estas mutantes estén alteradas a nivel de la maquinaria de síntesis de proteínas, como se ha descrito en algunas células Emt^{R} de la línea CHO

PRUEBAS DE RESISTENCIA CRUZADA PARA
LAS CLONAS Emt^R

CLONA	MEDIO LIQUIDO		MEDIO SEMISOLIDO	
	EMETINA	COLCHICINA	EMETINA	COLCHICINA
A	-	-	-	-
C ₁	-	-	-	-
C ₂	+	+	+	+
C ₃	+	+	+	+
C ₄	-	-	-	-
C ₅	-	-	-	-
C ₆	+	-	+	-
C ₇	-	-	-	-
C ₈	+	+	N.D.	N.D.
C ₉	+	-	+	-
C ₁₀	+	-	N.D.	N.D.
C ₁₁	-	-	N.D.	N.D.

+ Resistente.

- Sensible.

N.D. No determinado.

Trofozoítos de las clonas Emt^R, cultivadas durante 3 meses en ausencia de la droga, fueron inoculados en medio líquido con 12 µg/ml de emetina o 200 o 400 µg/ml de colchicina y en agar semisólido con 6 µg/ml de emetina o 300 µg/ml de colchicina. Las clonas resistentes en medio líquido fueron aquellas que crecieron a la misma velocidad que la clona respectiva en ausencia de las drogas. En medio semisólido las clonas resistentes fueron aquellas que mostraron una eficiencia de formación de colonias ≥50% de la misma clona en ausencia de las drogas.

(Gupta y Siminovitch, 1977).

En la fig 1 se observa que la clona silvestre, clona A, en presencia de emetina muere a las 192 h, y en presencia de 200 $\mu\text{g/ml}$ de colchicina la población permanece constante. En cambio la clona C_2 tiene un crecimiento normal en presencia de las 2 drogas (fig 2), mientras que la clona C_9 crece normalmente en presencia de emetina, pero no en presencia de colchicina, (fig 3).

Eritrofagocitosis, adhesión a eritrocitos y virulencia de las clonas C_2 y C_9 . Como uno de los objetivos de este trabajo fue el aislamiento de clonas amibianas deficientes en virulencia, era necesario asegurar que las clonas de las cuales se iba a partir presentaban los fenotipos Fag^+ , Vir^+ . Por lo tanto, trofozoítos de las clonas Emt^R , C_2 y C_9 se inocularon en hámsters jóvenes para medir su virulencia y se llevaron a cabo experimentos de eritrofagocitosis y de adhesión a eritrocitos para definir su eficiencia en comparación con la clona A, cuyo fenotipo es Vir^+ , Fag^+ ,

FIGURA 1

Prueba de resistencia cruzada para la clona A.

10^4 trofozoitos de la clona A se inocularon en medio TYI-S-33 en ausencia de la droga (o-o) o en presencia de 12 $\mu\text{g/ml}$ de emetina (●-●), 200 $\mu\text{g/ml}$ de colchicina (▲-▲) ó 400 $\mu\text{g/ml}$ de colchicina (▲-▲) y a diferentes tiempos se contó el número de trofozoitos viables.

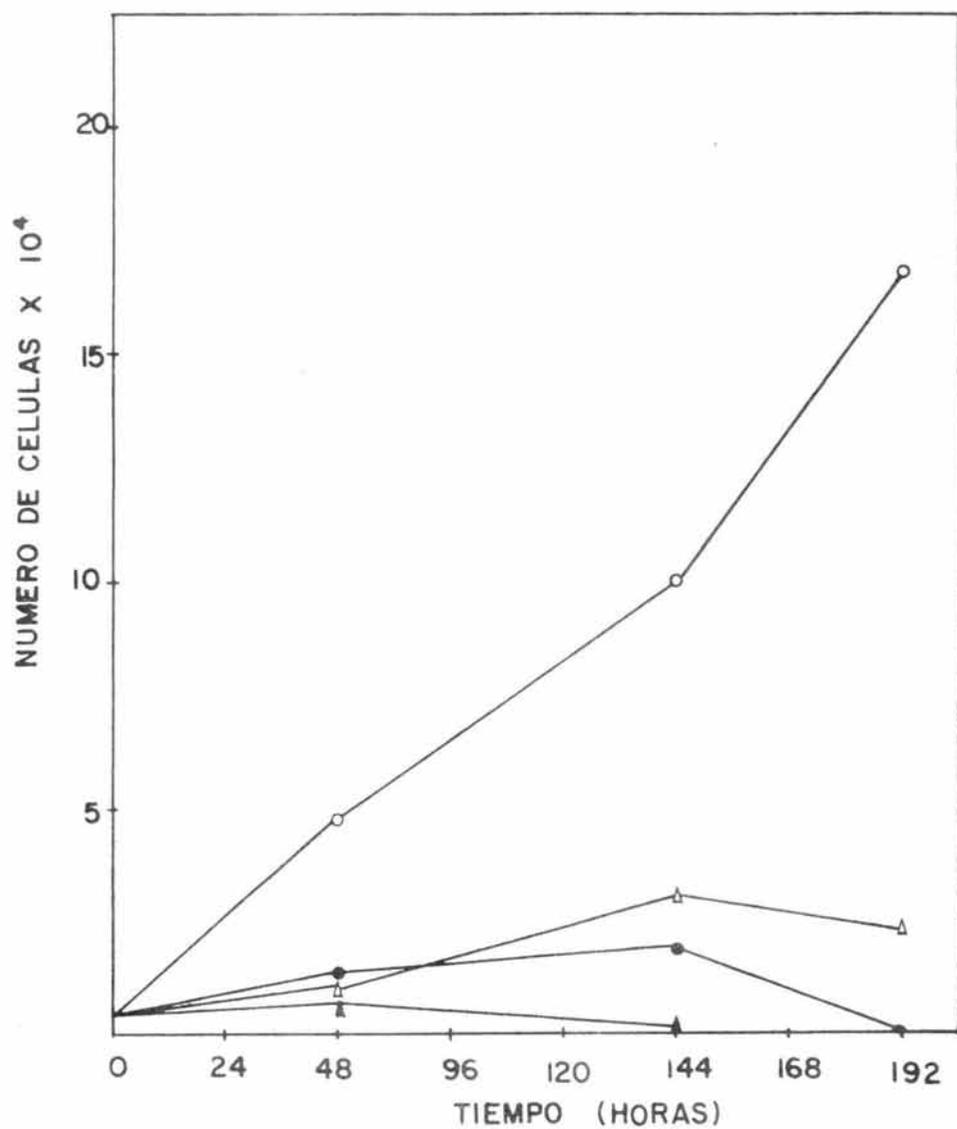


FIGURA 2

Prueba de resistencia cruzada para la clona C₂.

10⁴ trofozoítos de la clona C₂ se inocularon en medio TYI-S-33 en ausencia de droga (o-o) o en presencia de 12 µg/ml de emetina (●-●), 200 µg/ml de colchicina (Δ-Δ) ó 400 µg/ml de colchicina (▲-▲) y a diferentes tiempos se contó el número de trofozoítos viables.

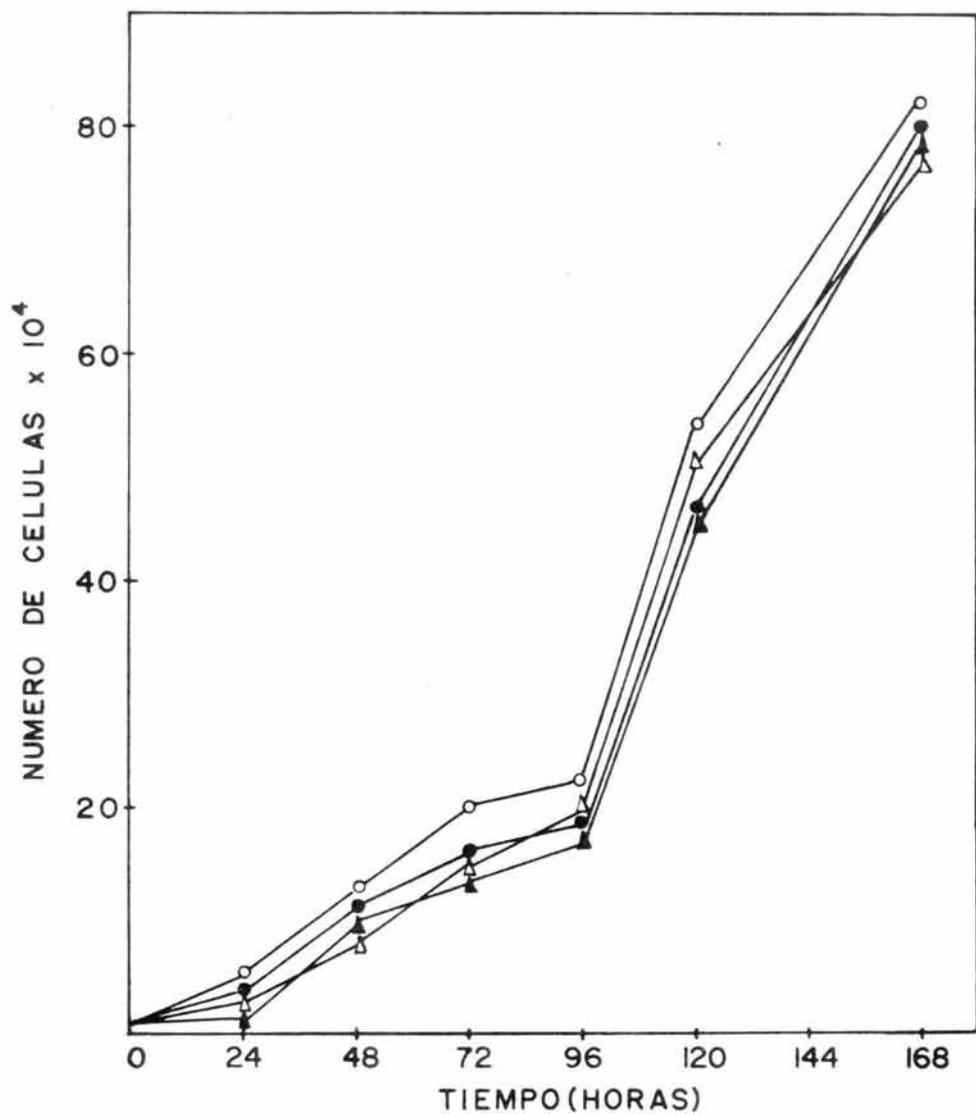
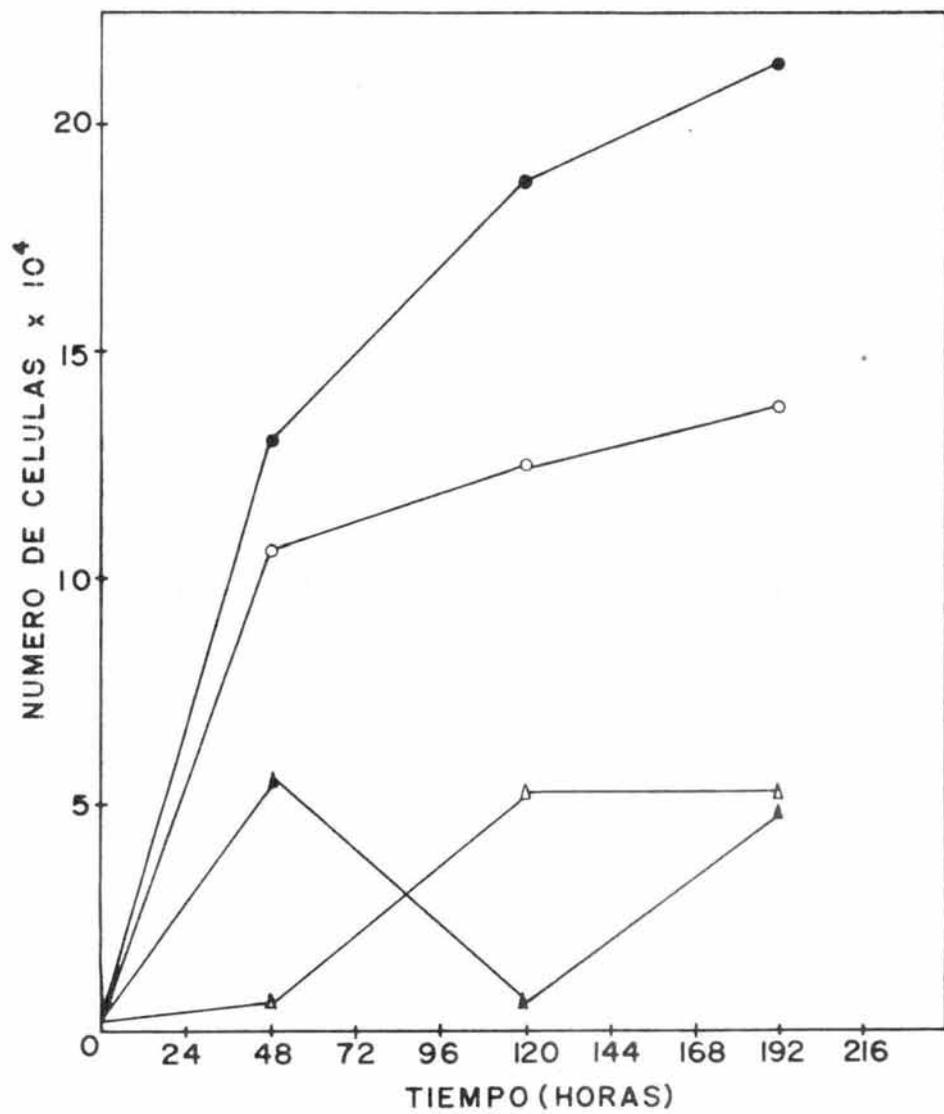


FIGURA 3

Prueba de resistencia cruzada para la clona C₉.

10⁴ trofozoítos de la clona C₉ se inocularon en medio TYI-S-33 en ausencia de droga (o-o) o en presencia de 12 µg/ml de emetina (●-●), ó 200 µg/ml de colchicina (△-△) o 400 µg/ml de colchicina (▲-▲) y a diferentes tiempos se contó el número de trofozoítos viables.



Adh⁺.

En la fig 4 se puede observar que la clona C₉ tiene una eritrofagocitosis similar a la de la clona silvestre a los 5 y 10 min, en cambio la clona C₂ es deficiente en eritrofagocitosis (Fag⁻), ya que fagocitó aproximadamente el 52% de lo que fagocitó la clona A a los 5 min, mientras que a los 10 min la deficiencia fue más aparente pues solo fagocitó el 35% de los eritrocitos ingeridos por la clona A.

Los experimentos de adhesión a eritrocitos muestran un comportamiento similar a lo observado en los experimentos de eritrofagocitosis. Es decir, la clona C₉ no mostró diferencia alguna en su eficiencia de adhesión con respecto a la clona silvestre, mientras que la clona C₂ adhirió solo el 53% de eritrocitos comparado con la eficiencia de la clona A a los 5 min. Esta deficiencia se hizo más aparente a los 10 min pues la clona C₂ solo adhirió el 35.7% de los eritrocitos adheridos por la clona A (fig 5).

FIGURA 4

Eritrofagocitosis de las clonas A, C₂ y C₉.

Trofozoítos de las clonas A (o-o), C₂ (●-●) y C₉ (Δ-Δ) se incubaron con eritrocitos humanos (1:100) durante 5 y 10 min a 37°C, al término de estos tiempos se agregó agua bidestilada para lizar los eritrocitos no ingeridos, las preparaciones se fijaron con glutaraldehído al 2.5%, los eritrocitos se contrastaron con diaminobencidina y se contaron en 100 amibas elegidas al azar.

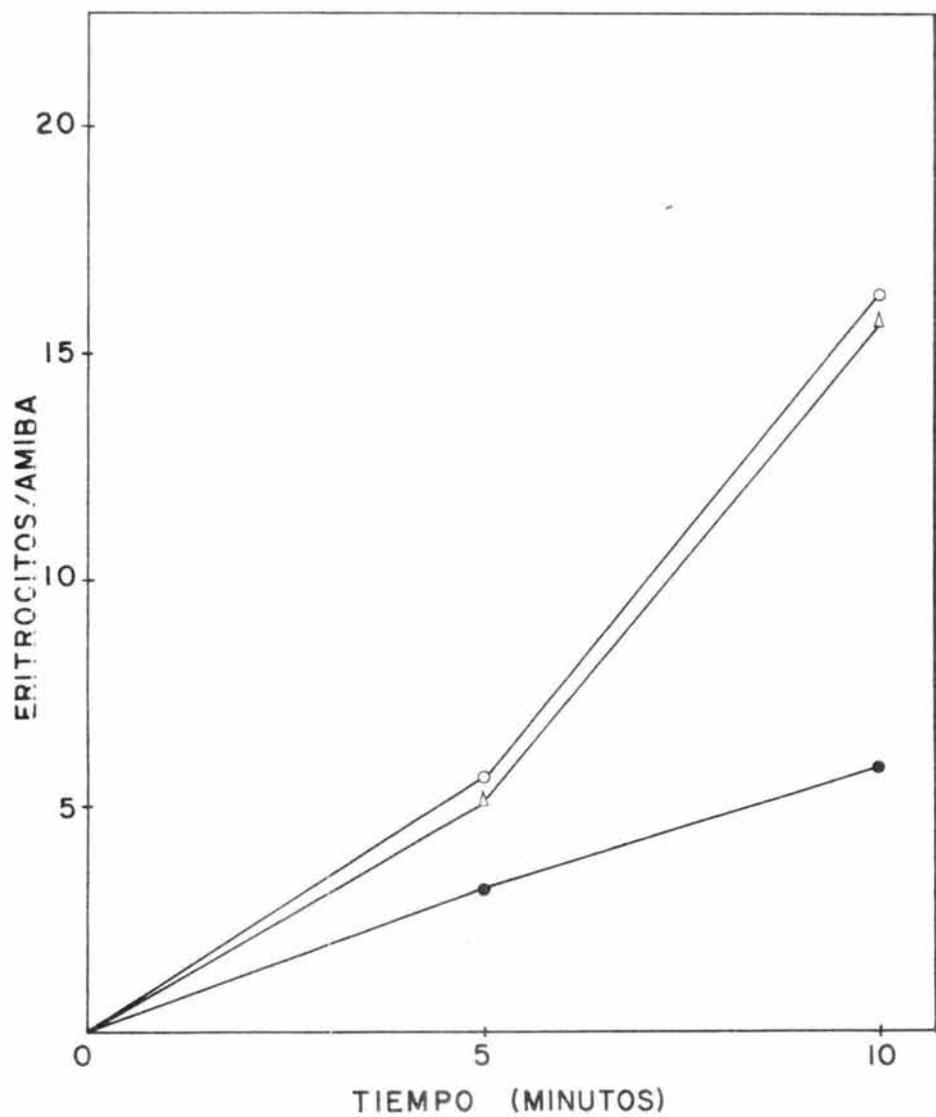
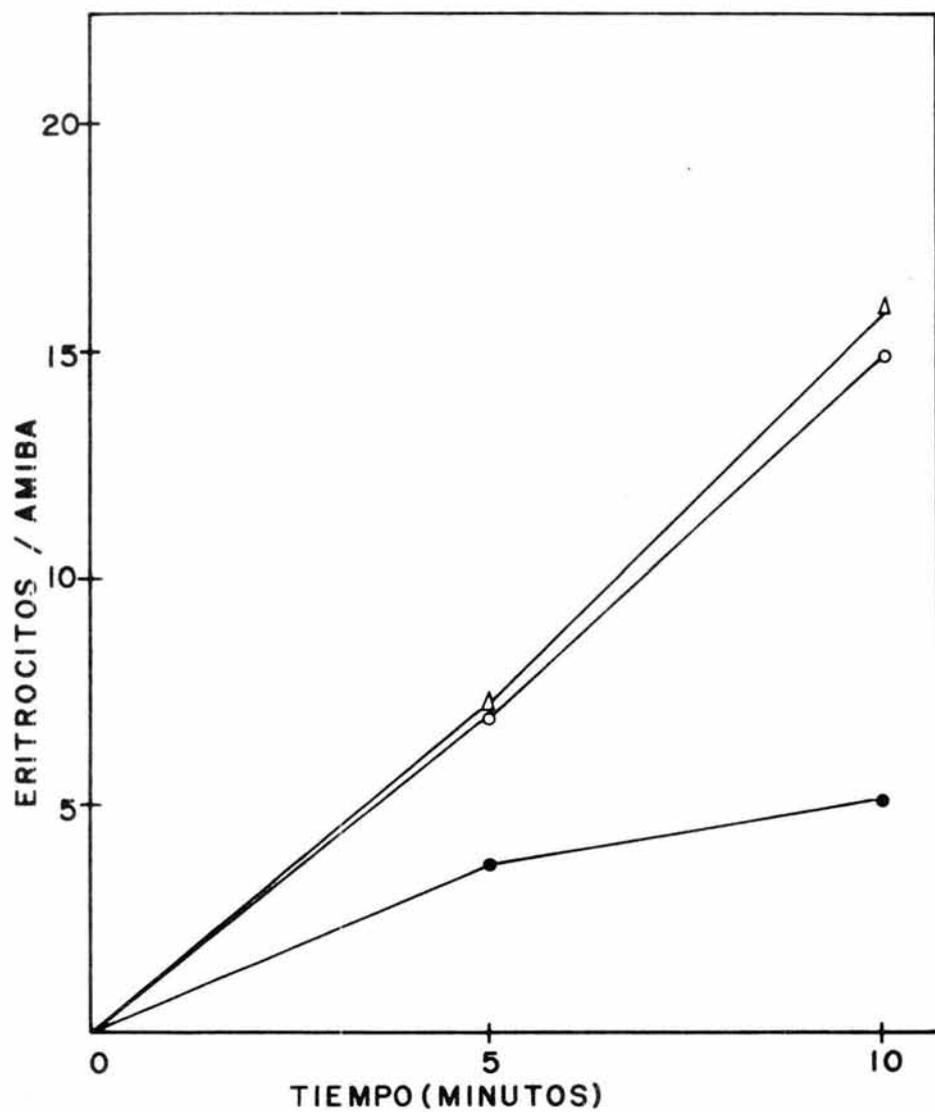


FIGURA 5

Adhesión a eritrocitos de las clonas A, C₂ y C₉.

Trofozoítos de las clonas A (o-o), C₂ (●-●) y C₉ (Δ-Δ) se incubaron con eritrocitos humanos (1:100) durante 5 y 10 min a 0°C. Al término de estos tiempos las preparaciones se fijaron con glutaraldehído al 2.5%, los eritrocitos se contrastaron con diaminobencidina y se contaron los eritrocitos adheridos en 100 amibas elegidas al azar.



La virulencia de estas 2 clonas también fue diferente (Tabla II). La clona C₉ mostró una virulencia similar a la de la clona A, mientras que la clona C₂ solo produjo abscesos hepáticos en el 50% de los animales inoculados. Estos resultados confirman que la fagocitosis y la adhesión correlacionan con la virulencia amibiana como ha sido propuesto por Trissl y col (1978), Orozco y col (1983) y Suárez (1983).

Selección de mutantes Fag⁻ a partir de la clona C₉. La clona C₉, Fag⁺, Adh⁺ y Vir⁺, se eligió como clona silvestre para el aislamiento de mutantes deficientes en virulencia.

Para la obtención de mutantes Fag⁻, la clona C₉ se mutagenizó con etil metano sulfonato (EMS) como fue descrito por Hernández (1985). Al retirar el mutágeno los trofozoítos se dividieron en 39 cultivos independientes. La selección de mutantes Fag⁻ se llevó a cabo por envenenamiento de los trofozoítos con alto grado de fagocitosis con bacterias crecidas en BudR y posterior irradiación con luz de 310 nm de longitud de onda

TABLA II

VIRULENCIA DE LAS CLONAS C₂ Y C₉

CLONA	VIRULENCIA (%)
A	100
C ₂	50
C ₉	87.5

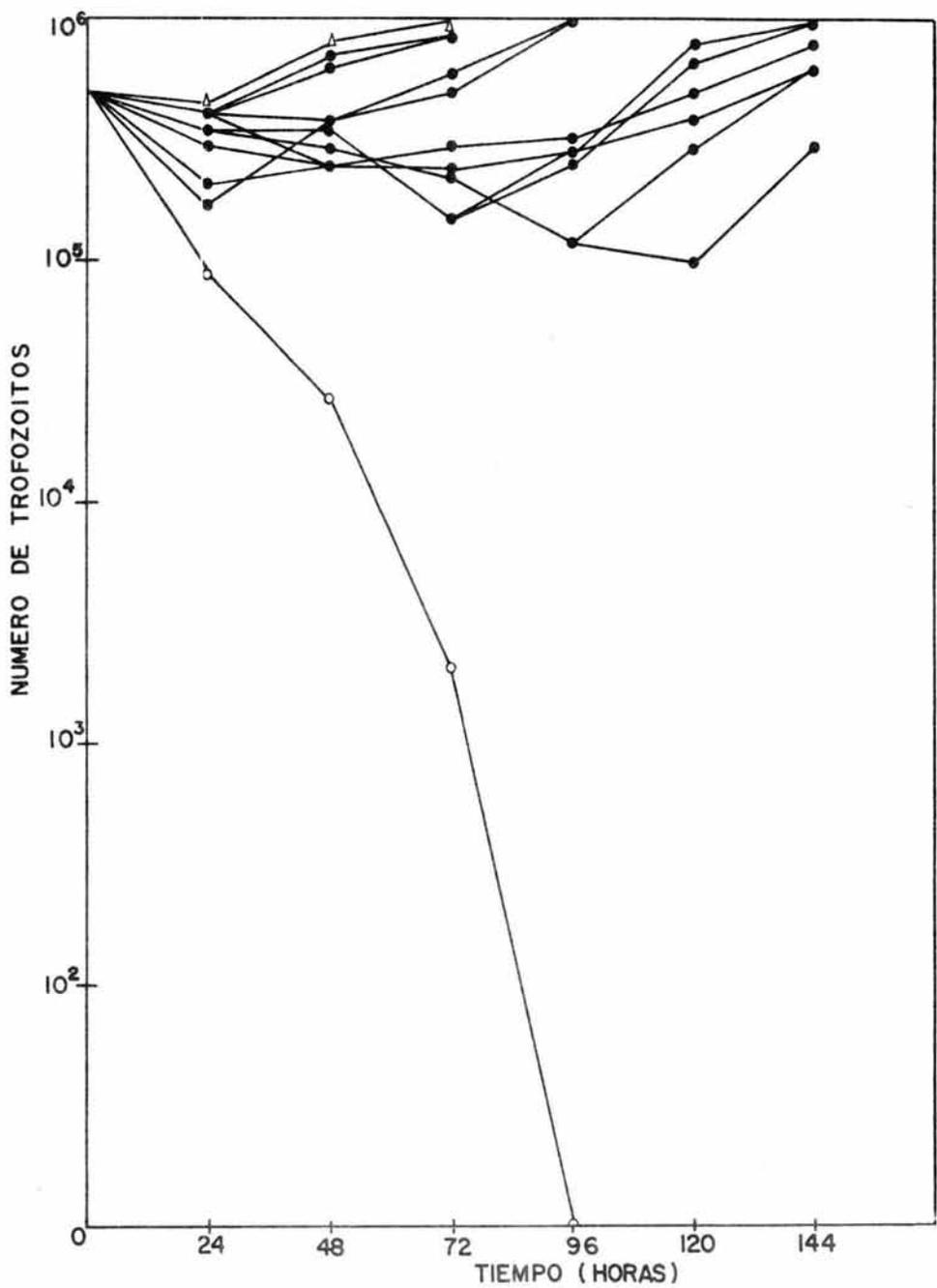
Para medir la virulencia se inocularon 2.5×10^5 trofozoítos en hámsters jóvenes, los hámsters se sacrificaron a los 8 días y se registró el % de animales inoculados que presentaron abscesos hepáticos. Se inocularon de 5 a 6 hámsters por clona.

como se describió en materiales y métodos. Después de la irradiación, la mayoría de los trofozoítos mutagenizados murieron por efecto del tratamiento. Sin embargo, se lograron recuperar trofozoítos viables en 11 de los cultivos. Cuando estos cultivos llegaron a la fase exponencial de crecimiento se midió el grado de fagocitosis y se encontró que solo uno de ellos presentaba una velocidad de fagocitosis semejante a la de la cepa silvestre, lo que nos indica que el método de selección es eficiente. Las 10 clonas Fac^- se sometieron a un segundo tratamiento de selección y como se puede observar en la Fig 6 el tratamiento no afectó significativamente a los cultivos previamente tratados, pues presentaron un comportamiento similar al que mostraron los trofozoítos de la clona C_9 alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con timidina. En cambio, todos los trofozoítos de la clona C_9 alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con BUdR murieron por efecto del tratamiento. Así se pudieron aislar 10 subpoblaciones sobrevivientes deficientes en fagocitosis en dos pasos de selección.

FIGURA 6

Crecimiento de las subpoblaciones después del segundo tratamiento de selección. Las poblaciones sobrevivientes a un primer paso de selección se incubaron durante 3 h con bacterias Escherichia coli cepa CR34 Thy⁻ crecidas en medio suplementado con 5-Bromo-deoxiuridina (BUdR), 24 h después los trofozoítos se irradiaron durante 2 h con luz de 310 nm de longitud de onda. Posteriormente se cultivaron en medio TYI-S-33 y se contó el número de trofozoítos viables a diferentes tiempos.

- o-o Trofozoítos de la clona C₉ alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con BUdR.
- Trofozoítos de las poblaciones sobrevivientes a un primer tratamiento de selección alimentados con bacterias crecidas con medio suplementado con BUdR.
- Δ-Δ Trofozoítos de la clona C₉ alimentados con bacterias crecidas en medio suplementado con timidina.



Clonación. Con el fin de obtener poblaciones homogéneas, a partir de las poblaciones sobrevivientes a los 2 pasos de selección, trofozoítos de cada una de ellas se inocularon en agar semisólido en presencia o ausencia de emetina de acuerdo a la técnica descrita por Gillin y Diamond (1978). La eficiencia relativa de formación de colonias (EFC_R) se obtuvo tomando como 100% la EFC de la clona C_9 en presencia de emetina. En la Tabla III se observa que 7 de las subpoblaciones mostraron una EFC_R en ausencia de emetina similar a la que presentó la clona C_9 . La subpoblación S_{917} mostró una EFC_R de 46%, mientras que la subpoblación S_{923} sólo presentó 14% de EFC_R . Por otra parte, la subpoblación S_{98} fue incapaz de formar colonias en agar semisólido, por lo que para obtener una población homogénea se clonó en medio líquido por la técnica de dilución limitada (Orozco y col, 1983).

Estos resultados demuestran que no hay relación directa entre la capacidad de crecer en agar y la virulencia amibiana, como había sido sugerido por otros investigadores (Gillin y Diamond, 1978).

TABLA III

EFICIENCIA DE FORMACION DE COLONIAS DE LAS
SUBPOBLACIONES C₉EMS-2X

SUBPOBLACION	EFICIENCIA RELATIVA DE FORMACION DE COLONIAS	
	6 µg/ml de emetina	0 µg/ml de emetina
C ₉	100	130
S ₉₋₃	22	120
S ₉₋₄	78	125
S ₉₋₈	0	0
S ₉₋₁₃	21	140
S ₉₋₁₅	23	78
S ₉₋₁₆	21	140
S ₉₋₁₇	46	46
S ₉₋₁₉	98	122
S ₉₋₂₃	3	14
S ₉₋₂₁₆	55	150

Trofozoítos en fase exponencial de crecimiento fueron inoculados en botellas Falcon con medio TYI-S-33-agar (0.48%). A los 7 días post-inoculación se contó el número de colonias. La eficiencia relativa de formación de colonias se determinó dividiendo la eficiencia de formación de colonias (EFC) de cada subpoblación entre la EFC de la clona C₉ en presencia de emetina y multiplicado por 100.

Sin embargo, en la misma tabla se puede observar que en la mayoría de las subpoblaciones hubo una disminución en su habilidad para formar colonias en agar semisólido en presencia de emetina.

De cada población se aisló una colonia para su caracterización de fagocitosis, adhesión, "actividad de toxina" y efecto citopático sobre células en cultivo.

Eritrofagocitosis. Para confirmar que las clonas aisladas eran deficientes en fagocitosis se midió el grado de eritrofagocitosis de cada una de ellas a los 5 y 10 min. En la Tabla IV se muestra el promedio de eritrocitos ingeridos por amiba para cada clona y como puede observarse, 9 de las clonas tuvieron un grado de fagocitosis menor que la clona C₉ a los 5 min ($p < 0.01$). Solamente la clona C₉₁₉ mostró una fagocitosis semejante a la clona silvestre en este tiempo. Sin embargo, todas las clonas aisladas ingirieron a los 10 min un número menor de eritrocitos que la clona silvestre ($p < 0.01$). Por lo tanto se lograron aislar 10 mutantes Fag⁻.

TABLA IV

ERITROFAGOCITOSIS DE LAS CLONAS AISLADAS

CLONA	ERITROFAGOCITOSIS (EPITROCITOS/AMIBA)	
	5 MIN	10 MIN
C ₉	5.4	16.5
C ₉₃	2.6	3.8
C ₉₄	2.7	8
C ₉₈	3.2	6
C ₉₁₃	2.6	4.7
C ₉₁₅	3	7
C ₉₁₆	2.5	7
C ₉₁₇	3.6	7.8
C ₉₁₉	4.5	10
C ₉₂₃	2.7	6.4
C ₉₂₁₆	3.6	8.4

Trofozoítos y eritrocitos humanos (1:100) se incubaron a 37°C durante 5 y 10 min. Al término de estos tiempos se agregó agua bidestilada para lisar los eritrocitos no ingeridos, las preparaciones se fijaron con glutaraldehído al 2.5%, los eritrocitos se contrastaron con diaminobencidina y se contó el número de eritrocitos ingeridos en 100 amibas elegidas al azar.

Si tomamos en cuenta que para la selección de mutantes Faq^- se irradiaron 2×10^7 trofozoítos y suponiendo que cada una de las 10 poblaciones sobrevivientes provenían de una sola célula, entonces la frecuencia de aparición de mutantes Faq^- fue de 5×10^{-7} , mientras que sin mutagenizar esta frecuencia fue $<10^{-8}$. Estos resultados muestran que la clona C_9 es una población altamente homogénea, ya que para aislar mutantes Faq^- a partir de esta clona se tuvo que utilizar un mutágeno. Así, hay buenas posibilidades de que las clonas Faq^- obtenidas en este trabajo no sean una variedad de E. histolytica lo que tal vez sucede con las clonas Faq^- que fueron aisladas a partir de una población muy heterogénea como es la cepa HM1:IMSS (Orozco, 1983; Suárez, 1983).

Adhesión a eritrocitos. Para saber si la deficiencia en fagocitosis presentada por las clonas aisladas de debía a una deficiencia en la adhesión, se realizaron pruebas de adhesión a eritrocitos. En la Tabla V se reporta el número promedio de eritrocitos adheridos por amiba para cada clona, como se puede observar 7 de

las clonas mostraron una adhesión normal tanto a los 5 como a los 10 min. La clona C₉₁₉ mostró un comportamiento similar al que presentó en los experimentos de eritrofagocitosis. Es decir, a los 5 min tuvo una adhesión similar a la de la clona silvestre, pero a los 10 min mostró una menor adhesión ($p < 0.01$). Por otra parte se obtuvieron 2 clonas que mostraron ser deficientes en adhesión (Adh⁻) desde los 5 min (C₉₈ y C₉₂₃) ($p < 0.01$). Por lo tanto se obtuvieron 3 clonas Adh⁻ y si tomamos en cuenta que se irradiaron 2×10^7 trofozoítos y suponiendo que cada población proviene de una sola célula, se obtuvo una frecuencia de aparición de mutantes Adh⁻ de 1.5×10^{-7} , mientras que a partir de la clona C₉ sin mutagenizar no se pudieron obtener mutantes Adh⁻ (frecuencia $< 10^{-8}$).

Virulencia. Como nuestro principal objetivo era aislar clonas de E. histolytica deficientes en virulencia, se procedió a caracterizar la virulencia de las mutantes Faq⁻ obtenidas. Para estas pruebas se inocularon intraportalmente 2.5×10^5 trofozoítos en hámsters jóvenes de aproximadamente 100 g de peso. 8 días

TABLA V

ADHESION A ERITROCITOS DE LAS MUTANTES FAG⁻

CLONA	A D H E S I O N	
	(ERITROCITOS/AMIBA)	
	5 MIN	10 MIN
C ₉	7.5	17
C ₉₃	7	15
C ₉₄	6.2	13
C ₉₈	3.4	5
C ₉₁₃	4.8	11.6
C ₉₁₅	7.1	16.4
C ₉₁₆	7.2	15.3
C ₉₁₇	9	13.6
C ₉₁₉	6.1	9.1
C ₉₂₃	4.1	6
C ₉₂₁₆	6.2	16.1

Trofozoítos y eritrocitos humanos (1:100) se incubaron a 4°C durante 5 y 10 min. Al término de estos tiempos las preparaciones se fijaron con glutaraldehído al 2.5%, los eritrocitos se contrastaron con diaminobencidina y se contaron las eritrocitos adheridos en 100 amibas elegidas al azar.

post-inoculación se extrajo el hígado para localizar la presencia y tamaño de los abscesos. En la Tabla VI se observa que todas las clonas tuvieron un grado de virulencia menor al 50% (Vir^-) del presentado por la clona silvestre. Además, los abscesos producidos por las clonas Faq^- fueron más pequeños que los producidos por la clona C_9 . Así, se demostró una vez más la relación existente entre la fagocitosis y la virulencia amibiana.

Dado que la mayoría de las clonas fueron Adh^+ se puede afirmar que la adhesión, aunque es un evento importante para la virulencia amibiana, no es por sí misma suficiente para que se exprese la agresividad de este parásito.

"Actividad de toxina" de los extractos amibianos.

Lushbauch y col (1978), Bos y col (1980) y Mattern y col (1980) han postulado que la "actividad de toxina" de los extractos amibianos juega un papel importante en la agresividad de E. histolytica. Para definir si realmente este es un factor involucrado en la virulencia,

TABLA VI

VIRULENCIA DE LAS MUTANTES FAG⁻

CLONA	VIRULENCIA (%)
C ₉	87.5
C ₉₃	20
C ₉₄	0
C ₉₈	37.5
C ₉₁₃	20
C ₉₁₅	20
C ₉₁₆	0
C ₉₁₇	33
C ₉₁₉	0
C ₉₂₃	20
C ₉₂₁₆	20

2.5×10^5 trofozoitos fueron inoculados en hámsters jóvenes, los animales se sacrificaron a los 8 días y se registró el % de animales inoculados que presentaron abscesos hepáticos. Se inocularon de 5 a 6 hámsters por clona.

se realizaron pruebas de "actividad de toxina" sobre monocapas de células epiteliales de la línea MDCK, con los extractos de las mutantes Fag⁻, Vir⁻ obtenidas en el presente trabajo. Después de 1 h o más de interacción entre los extractos y las monocapas se determinó el grado de destrucción de las mismas como se describe en Materiales y Métodos. En la Tabla VII se puede observar que 7 de las clonas tuvieron una "actividad tóxica" sobre las células en cultivo similar a la que mostró la clona silvestre. Los extractos de las clonas C₉₃, C₉₄ y C₉₁₅ no destruyeron las monocapas (Tox⁻). Por lo tanto, como la mayoría de las mutantes Fag⁻, Vir⁻ presentaron un fenotipo Tox⁺, se puede concluir que esta actividad no es un fenómeno biológico que sea suficiente para el establecimiento de la agresividad amibiana. Aunque no se descarta que factores citoplásmicos involucrados en la agresividad de la amiba participen en la destrucción de las monocapas celulares.

Efecto citopático sobre células epiteliales en cultivo. Varios investigadores han reportado una

TABLA VII

EFFECTO CITOTOXICO DE LOS EXTRACTOS AMIBIANOS DE
LAS MUTANTES FAG⁻, VIP⁻

CLONA	"ACTIVIDAD DE TOXINA" (%)
C ₉	100
C ₉₃	20
C ₉₄	0
C ₉₈	100
C ₉₁₃	100
C ₉₁₅	20
C ₉₁₆	100
C ₉₁₇	100
C ₉₁₉	100
C ₉₂₃	100
C ₉₂₁₆	100

Monocapas de la línea MDCK y extractos de trofozoítos (1:10) se pusieron en contacto durante 1 h a 37°C. Posteriormente se midió el grado de destrucción de la monocapa como se indica en materiales y métodos.

relación directa entre la virulencia de las cepas amibianas y la capacidad de éstas para destruir monocapas de células en cultivo (Mattern y col, 1978; Orozco y col, 1978; Ravdin y col, 1980). Para confirmar esta relación se midió el efecto citopático de las clonas Fag^- , Vir^- sobre monocapas de células epiteliales de la línea MDCK. En la Tabla VIII se presentan los resultados de la destrucción de la monocapa producida por las diferentes clonas después de 1 h de interacción a 37°C. Todas las clonas obtenidas en el presente trabajo tuvieron una menor habilidad para destruir la monocapa (Ctp^-) en comparación con la clona C_9 . Por lo tanto, se confirma que el efecto citopático sobre células en cultivo correlaciona directamente con la virulencia amibiana medida in vivo, por lo que este ensayo puede utilizarse para pruebas de virulencia in vitro.

Interacción de trofozoitos Vir^- con células de la línea CHO. Para saber si las mutantes obtenidas eran también incapaces de producir daño en otros sistemas normalmente utilizados para cuantificar la

TABLA VIII

EFEECTO CITOPATICO DE LAS MUTANTES FAG⁻ VIR⁻ SOBRE CELULAS
EPITELIALES EN CULTIVO

CLONA	EFEECTO CITOPATICO (%)
C ₉	100
C ₉₃	21
C ₉₄	15
C ₉₈	10
C ₉₁₃	40
C ₉₁₅	38
C ₉₁₆	28
C ₉₁₇	N.D.
C ₉₁₉	0
C ₉₂₃	17
C ₉₂₁₆	25

Monocapas celulares de la línea MDCK y trofozoitos vivos se incubaron en una relación 1:1 durante 1 h a 37°C. Posteriormente se midió el grado de destrucción de la monocapa como se indica en materiales y métodos.

virulencia amibiana in vitro, se procedió a medir el grado de agresividad de una mutante Fag^- , Adh^+ y de una Fag^- , Adh^- sobre células de la línea CHO de acuerdo a la técnica descrita por Ravdin y col (1980). En este tipo de experimentos se tomó como control positivo el daño producido por los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS y como control negativo la clona L-6 (Fag^- , Adh^+ , Vir^-) (Orozco y col, 1983). En la Tabla IX se observa que después de 2 h de interacción entre trofozoítos de la cepa HM1:IMSS y células de la línea CHO el porcentaje de células CHO viables es de 15.84%, mientras que en los experimentos de interacción de células CHO con trofozoítos de la clona L-6 el 85.23% de células CHO permanecen vivas. En los experimentos de interacción de células CHO con trofozoítos de las clonas C_{93} y C_{919} el 61 y 40% de células CHO permanecen vivas.

Estos resultados correlacionan con los obtenidos de los experimentos de fagocitosis, es decir, que estas mutantes tienen un grado intermedio de fagocitosis entre las poblaciones silvestres Fag^+ , Vir^+ y la clona L-6, Fag^- , Vir^- . Además de estos resultados se puede

TABLA IX

INTERACCIÓN DE TROFOZOITOS VIR⁻ CON CELULAS DE LA
LINEA CHO

CLONA	% DE CELULAS CHO		
	VIVAS	MUERTAS	FAGOCITADAS O LISADAS
HM1:IMSS	15.84	22.38	61.78
L-6	85.23	2.11	12.66
C ₉₃	61	9.31	21.69
C ₉₁₉	40	3.3	56.7

Trofozoítos y células CHO (1:20) se pusieron en contacto durante 3 h a 37°C. Posteriormente se determinó el porcentaje de células CHO vivas y muertas por el método de exclusión de azul de tripano. Las células fagocitadas se obtuvieron de la diferencia entre el número total de células al inicio del experimento menos la suma de las células vivas y muertas.

decir que las mutantes obtenidas presentan deficiencia para producir daño en otros sistemas utilizados para medir virulencia in vitro.

Adhesión a células de la línea CHO. Para determinar si las mutantes Adh^- obtenidas en el presente trabajo eran deficientes también para adherirse a otro tipo de células, se eligió una de las clonas Adh^- para realizar experimentos de adhesión a células de la línea CHO de acuerdo a la técnica descrita por Ravdin y col (1981). Como controles positivos se utilizaron trofozoítos de la cepa HM1:IMSS (Adh^+ , Fag^+ , Vir^+) y de las clonas L-6 y C_{93} (Adh^+ , Fag^- , Vir^-). En la Tabla X se muestra que el 79.15% de los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS son capaces de formar rosetas, en interacción con células CHO mientras que trofozoítos de las mutantes C_{93} , C_{919} y L-6 tuvieron un porcentaje de rosetas más bajo 14.33, 19.23 y 10.12% respectivamente.

Estos resultados sugieren que para el fenómeno de adhesión de la amiba existen más de un tipo de receptores ya que las clonas C_{93} y L-6 son eficientes para

TABLA X

ADHESION DE TROFOZOITOS VIR⁻ A CELULAS DE LA LINEA CHO

CLONA	% DE ROSETAS
HM1:IMSS	79.15
L-6	10.12
C ₉₃	14.33
C ₉₁₉	19.23

Trofozoitos y células de la línea CHO (1:20) se pusieron en contacto durante 3 h a 0°C. Posteriormente se determinó el porcentaje de trofozoitos que adhirieron 3 o más células CHO (roseta).

adherirse a eritrocitos humanos pero no a células CHO.

Interacción entre polimorfonucleares y E. histolytica. Guerrant y col (1981) encontraron que los trofozoítos de cepas poco virulentas son más fácilmente destruidos por polimorfonucleares humanos (PMN's) que los trofozoítos de las cepas más virulentas. Además, los trofozoítos de las cepas menos virulentas son incapaces de destruir a los PMN's. Para determinar si las mutantes Vir^- siguen el comportamiento reportado por estos autores, las clonas C_{93} , C_{98} , C_{919} y L-6 se mezclaron con PMN's y se incubaron a 37°C. Como puede observarse en la Tabla XI los trofozoítos de las mutantes Fag^- , Vir^- son más fácilmente destruidos por los PMN's en comparación con los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS, a su vez dos de estas clonas tuvieron un menor efecto sobre la viabilidad de los PMN's en comparación con la cepa HM1:IMSS. Sin embargo, las clonas C_{93} y C_{919} tuvieron un efecto similar al que mostró la cepa HM1:IMSS.

Estos resultados sugieren que la relación huésped-parásito es más compleja en comparación con los ensayos in vitro.

TABLA XI

INTERACCION ENTRE PMN's Y E. HISTOLYTICA

CLONA	% DE AMIBAS		% DE PMN's	
	VIVAS	MUERTAS	VIVOS	MUERTOS
Hm1:IMSE	73.2	24	12.2	21.7
L-6	10.7	14	51.3	6.4
C ₉₃	29.5	11.6	27.4	11.6
C ₉₈	14.7	4.15	41.2	11.8
C ₉₁₉	19.6	11.6	18.1	9.3

Trofozoítos y PMN's (1:200) se pusieron en contacto durante 3 h. a 37°C. Posteriormente se midió el porcentaje de amibas y PMN's vivos y muertos mediante la técnica de exclusión de azul de tripano.

Actividad de lectina. Para determinar si existe relación entre la virulencia y la actividad de los extractos amibianos para aglutinar células de la línea CHO (actividad de lectina) como reportaron Ravdin y col (1985) se midió la actividad de lectina de las mutantes C₉₃, C₉₁₉ y L-6. En la Tabla XII se muestra que la actividad de lectina de la mutante C₉₁₉ es mucho menor que la de la cepa HMI:IMSS. Sin embargo, la diferencia existente entre la actividad de lectina de la cepa control y de las clonas C₉₃ y L-6 no parece suficiente para explicar la gran diferencia existente entre estas amibas en su grado de virulencia.

Por otra parte, el hecho de que la clona C₉₁₉ (Adh⁻) tenga una actividad de lectina baja podría explicar la deficiencia de esta clona para adherir tanto eritrocitos como células de la línea CHO.

TABLA XII

ACTIVIDAD DE LECTINA DE MUTANTES VIR^T

CLONA	ACTIVIDAD DE LECTINA
HM1:IMSS	68.18
L-6	43.2
C ₉₃	50.9
C ₉₁₉	22.33

Varias diluciones de sonicados de las diferentes clonas se pusieron en contacto con células de la línea CHO previamente fijadas con glutaraldehído y se incubaron durante 1 h a 4°C en agitación. Posteriormente se midió el grado de aglutinación. La actividad se determinó a partir de la mínima concentración de proteína que produjo aglutinación y el grado de aglutinación se dividió entre la cantidad de proteína presente.

DISCUSION

La virulencia de E. histolytica es un proceso complejo en el cual se han involucrado varias propiedades y actividades biológicas. La estrategia utilizada en el presente trabajo para el estudio de la virulencia de este parásito fue el aislamiento de mutantes con deficiencias en fenómenos involucrados en la agresividad amibiana. Para realizar este trabajo se partió de trofozoitos que contenían el marcador genético de resistencia a emetina, un inhibidor de la síntesis de proteínas. Como el fenotipo de resistencia a alguna droga puede ser debida a alteraciones en la membrana plasmática y dado que la membrana parece tener un papel muy importante en la virulencia amibiana se determinó de una manera sencilla el posible nivel de alteración que presentaban los trofozoitos Emt^R. Para esto se realizaron pruebas de resistencia cruzada a colchicina y mediante esta técnica se identificaron 2 tipos de mutantes, por un lado, las mutantes que también fueron resistentes a colchicina, por lo que parece ser que presentar alteraciones a nivel de membrana que cambian su permeabilidad disminuyendo o

impidiendo el paso de las drogas al interior de la célula y por lo tanto esta alteración le da el fenotipo de Emt^R y Col^R. El otro grupo de mutantes fue sensible a colchicina, lo que sugiere que estas mutantes presentan alteraciones a nivel de la maquinaria de síntesis de proteínas como las que han sido descritas para células de mamífero de la línea CHO resistentes a emetina, en donde se encontró que alteraciones en la subunidad ribosomal 40S son las responsables del fenotipo Emt^R (Gupta y Siminovitch, 1977).

Una clona representativa de cada grupo de mutantes se tomó para realizar pruebas de fagocitosis, adhesión y virulencia. La clona C₂ (Emt^R, Col^R) fue deficiente en adherir eritrocitos, lo que confirma que esta mutante presenta alteraciones en la membrana plasmática. La velocidad de eritrofagocitosis y la virulencia de esta clona disminuyeron en correlación con su deficiencia en adhesión, lo que sugiere una correlación directa entre los fenómenos de adhesión, fagocitosis y virulencia.

La clona C₉ Emt^R, Col^S presentó eritrofagocitosis,

adhesión a eritrocitos y virulencia similar a la de la clona silvestre, por lo que la única diferencia encontrada entre las clonas A y C₉ es la resistencia a emetina. Así, se eligió a la clona C₉ como clona silvestre para aislar las mutantes deficientes en fagocitosis.

Al tratar de obtener mutantes Fag⁻ a partir de la clona C₉ sin mutagenizar no se logró obtener ninguna mutante después de utilizar 10⁸ trofozoítos. Este resultado sugiere que la clona C₉ está compuesta de una población altamente homogénea a diferencia de las cepas que normalmente se usan en la investigación sobre E. histolytica donde las poblaciones que las forman son muy heterogéneas (Orozco y col, 1985). Cuando la clona C₉ se mutagenizó con EMS, se lograron obtener 11 subpoblaciones sobrevivientes al tratamiento de selección. 10 de éstas mostraron ser diferentes en fagocitosis. Así, el método de selección mostró una buena eficiencia. La subpoblación Fag⁺ sobreviviente al tratamiento de selección probablemente tenga alteraciones en el mecanismo de incorporación de pirimidinas, por ejemplo, en la enzima timidina kinasa, por lo que a pesar de inoerir

muchas bacterias, la DMR acarreada por éstas no se incorporó en el genoma amibiano.

Las 10 subpoblaciones Fag^- sobrevivientes al primer tratamiento de selección se sometieron a un segundo tratamiento y todas las subpoblaciones se lograron recuperar en un tiempo menor al que se necesitó para recuperarlas después del primer tratamiento, lo cual probablemente se debió a que la mayor parte de los trofozoitos utilizados para el segundo tratamiento eran deficientes en fagocitosis.

Las subpoblaciones sobrevivientes a los 2 pasos de selección se clonaron en agar semisólido con el fin de obtener poblaciones homogéneas. 7 de estas subpoblaciones mostraron una eficiencia de formación de colonias en ausencia de emetina similar a la que presenta la clona C_9 , lo que sugiere que no existe relación entre la capacidad de crecer en agar semisólido y la virulencia como postularon otros investigadores (Gillin y Diamond, 1978). Por otra parte se encontraron 3 mutantes que mostraron ser deficientes en su capacidad de

crecer en agar semisólido (Ag^-), estas mutantes tal vez tengan una alteración semejante a la que presenta la clona L-6, Fag^- , Vir^- , Ag^- , aislada por Grozco y col (1982). Sin embargo, algunas de las subpoblaciones mostraron deficiencia en formar colonias en presencia de emetina, aunque en ausencia de ésta mostraron una buena eficiencia. Aunque no tenemos una explicación clara para esto, es probable que el EMS haya causado cierto grado de reversión, ya que, tal vez, como en otras células eucarióticas, la resistencia a emetina sea un carácter recesivo, por lo que modificaciones causadas por el mutágeno sobre uno de los alelos responsables de dar el fenotipo de resistencia a emetina, daría como resultado un fenotipo de sensibilidad a la droga.

De cada una de las subpoblaciones clonadas se tomó una colonia de las que crecieron en presencia de emetina y se crecieron en medio líquido en presencia de 12 $\mu g/ml$ de la droga y todas presentaron una velocidad de crecimiento normal.

Al medir el grado de eritrofagocitosis de las clonas aisladas se encontró que todas fueron Fac^- , 9 de ellas mostraron su deficiencia desde los 5 min de interacción con los eritrocitos, solamente la clona C_{919} mostró una fagocitosis similar a la que presenta la clona silvestre a éste tiempo, sin embargo, conforme avanza el tiempo de interacción con los eritrocitos se hace más evidente la deficiencia de esta clona para ingerir eritrocitos.

El proceso de fagocitosis es un fenómeno complejo en el que participan varios eventos. El primero de éstos es la adhesión a la célula que se va a fagocitar. Así, la deficiencia en fagocitosis mostrada por las mutantes aisladas pudo haber sido debida a deficiencia en la adhesión a la célula blanco. Para probar esto, se hicieron pruebas de adhesión a eritrocitos y se encontró que la mayoría de las mutantes presentaban una adhesión semejante a la que presentó la clona silvestre, por lo que la deficiencia en estas mutantes se presenta durante el proceso de ingestión. Sin embargo, 3 de las mutantes, las clonas C_{98} , C_{919} y C_{923} , fueron deficientes

en adherir eritrocitos, 2 de ellas, las clonas C₉₈ y C₉₂₃, mostraron ser deficientes desde tiempos tempranos por lo que podría sugerir que en estas mutantes están alteradas o ausentes las moléculas especializadas para la adhesión a eritrocitos. Estas mismas clonas fueron deficientes para formar colonias en agar semisólido. Sin embargo, no sabemos si las dos deficiencias, adhesión y crecimiento en agar, sean debidas a una sola mutación pleiotrópica o bien a que tengan más de un gen alterado, tampoco sabemos si estas dos mutantes están alteradas en los mismos loci. La clona C₉₁₉ mostró a los 5 min una eficiencia de adhesión similar a la de la clona silvestre, pero conforme avanzó el tiempo la deficiencia se hizo más aparente. Este comportamiento tal vez sea debido a la presencia de un número bajo de moléculas receptoras, por lo que éstos se saturan rápidamente. Por otra parte, el comportamiento similar en adhesión y fagocitosis que presenta la clona C₉₁₉ confirma la relación existente entre estos dos eventos, ya que para la ingestión de eritrocitos se necesita una previa adhesión de éstos a la membrana plasmática amibiana.

La frecuencia de aparición de mutantes Fac^- (5×10^{-7}) y de mutantes Adh^- (1.5×10^{-7}) cae dentro de los valores reportados para otros marcadores amibianos (Orozco y col, 1985) y en otros sistemas eucarióticos (Gupta y Siminovitch, 1976). Además como no se pudieron aislar sin la ayuda de un mutágeno, pensamos que las clonas aisladas en el presente trabajo son verdaderas mutantes y no variedades de E. histolytica como puede pensarse de las clonas Fac^- aisladas anteriormente (Orozco, 1983; Suárez, 1983).

Posteriormente se midió el grado de virulencia de las mutantes Fac^- aisladas en el presente trabajo y se encontró que todas las mutantes fueron deficientes para producir abscesos hepáticos en hámsters jóvenes. Así se confirma nuevamente la relación que existe entre la fagocitosis y la adhesión con la virulencia amibiana.

A cada una de las mutantes se le caracterizó en algunas propiedades a las que se les ha correlacionado con la virulencia de las cepas amibianas. Como primer paso se caracterizó la capacidad de los extractos

amibianos para producir daño sobre células epiteliales en cultivo y se encontró que 7 de las mutantes presentaron una "actividad de toxina" idéntica a la de la clona C₉. Este dato indica que no hay una correlación directa entre la "actividad de toxina" y la virulencia de *E. histolytica*. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que en la agresividad amibiana participen ciertas toxinas o actividades enzimáticas, ya que los extractos de 3 de las mutantes presentaron una "actividad de toxina" menor a la que mostró la clona silvestre, como estas mutantes fueron aisladas como deficientes en fagocitosis, al encontrar clones deficientes en la "actividad de toxina" (Tox⁻) se sugiere que esta actividad sea necesaria durante el proceso de fagocitosis.

También se midió la capacidad de los trofozoítos de las clones mutantes para producir daño sobre monocapas de células epiteliales en cultivo. Se encontró que todas las mutantes Fag⁻, Vir⁻ tuvieron un efecto citopático menor al que mostró la clona C₉. Por lo tanto se confirmó la correlación existente entre el efecto citopático sobre células en cultivo y la virulencia

amibiana como han postulado otros investigadores (Mattern y col, 1978; Orozco y col, 1978; Ravdin y col, 1980). La agresividad de E. histolytica sobre las monocapas en cultivo parece ser un proceso en el que interviene la fagocitosis (Orozco y col, 1980, 1982; Ravdin y col, 1980) por lo que este ensayo se podría utilizar para efectuar pruebas de virulencia in vitro.

De acuerdo a las características antes mencionadas de cada una de las clonas aisladas, se pueden formar 3 grupos diferentes de mutantes (Tabla XIII) las cuales presentan 3 características en común: deficiencia en fagocitosis, deficiencia de destruir células en cultivo y deficiencia en virulencia. Por lo tanto se le puede asignar un papel esencial a la fagocitosis para expresar la agresividad de este parásito. Debido a la importancia de la fagocitosis en la virulencia amibiana, consideramos a este fenómeno como un factor primario de virulencia.

Los 3 grupos antes mencionados presentan diferencias con respecto a su adhesión y a su "actividad de

TABLA XIII

AGRUPACION DE LAS MUTANTES DE ACUERDO A SUS FENOTIPOS

C L O N A S	F E N O T I P O S				
C ₉	Fag ⁺	Adh ⁺	Tox ⁺	Ctp ⁺	Vir ⁺
C ₉₈ , C ₉₁₉ , C ₉₂₃	Fag ⁻	Adh ⁻	Tox ⁺	Ctp ⁻	Vir ⁻
C ₉₃ , C ₉₄ , C ₉₁₅	Fag ⁻	Adh ⁺	Tox ⁻	Ctp ⁻	Vir ⁻
C ₉₁₃ , C ₉₁₆ , C ₉₁₇ , C ₉₂₁₆	Fag ⁻	Adh ⁺	Tox ⁺	Ctp ⁻	Vir ⁻

Con las mutantes aisladas se lograron formar 3 grupos diferentes de acuerdo a los fenotipos mostrados para fagocitosis, adhesión a bacterias, "actividad de toxina", efecto citopático y virulencia.

toxina", dado que estos fenómenos parecen ser importantes para la expresión de la virulencia amibiana, pero por si mismos no son causantes de la agresividad de este parásito, se denominaron factores secundarios de virulencia.

Por otra parte, como la mayoría de las mutantes Fag^- fueron eficientes para formar colonias en agar semisólido, pensamos que esta propiedad no correlaciona con la virulencia como se había sugerido por otros autores (Gillin y Diamond, 1978). Además Orozco y col (1983) aislaron clones revertantes en virulencia a partir de la clona L-6 (Fag^- , Vir^- , Ag^-) que recuperaron su actividad fagocítica pero no la capacidad de crecer en agar. Por lo tanto consideramos que la capacidad para crecer en agar semisólido no tiene ninguna relación con la virulencia.

Algunas de las mutantes deficientes en virulencia se caracterizaron en otras propiedades como son la interacción con células de la línea CHO, adhesión a células CHO y actividad de lectina inhibible por N-acetil-D-galactosamina.

De la interacción con células de la línea CHO se encontró que las mutantes probadas (C_{93} y C_{919}) tenían un efecto intermedio sobre la muerte y fagocitosis de las células CHO con respecto a la cepa HM1:IMSS y a la clona L-6 lo que coincide con el grado de exitrofagocitosis que presentan los trofozoítos de cada cepa o clona. Este resultado también sugiere la importancia que tiene la fagocitosis en la agresividad amibiana, ya que mutantes deficientes en fagocitosis tienen disminuida su eficiencia para agredir células de la línea CHO. Así, las mutantes Vir^- aisladas en el presente trabajo mostraron ser menos agresivas en otro tipo de sistema utilizado para medir la virulencia in vitro, por lo que esta técnica y la de medir el efecto citopático sobre monocapas celulares en cultivo pueden ser utilizadas para determinar rápidamente la virulencia de E. histolytica.

Con respecto a las pruebas de adhesión a células de la línea CHO se encontró que las mutantes probadas, C_{93} , C_{919} y L-6, presentaron un menor porcentaje de trofozoítos formando rosetas con respecto a las que

formaron los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS lo que parece indicar una deficiencia en adhesión de las clonas probadas. Sin embargo, las clonas C₉₃ y L-6 son tan eficientes como la cepa HM1:IMSS para adherir eritrocitos. Estos resultados sugieren la existencia de más de un tipo de receptor en la superficie amibiana responsables de efectuar la unión de los trofozoítos a las células blanco.

En la interacción con las mutantes Vir⁻ con polimorfonucleares humanos (PMN's) se encontró que los trofozoítos de estas mutantes eran más rápidamente destruidos por los PMN's que los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS.

Sin embargo, los PMN's fueron afectados por los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS y de las clonas C₉₃ y C₉₁₉ de manera similar. Estos resultados sugieren que los PMN's juegan un papel importante en la defensa del organismo durante la infección de E. histolytica y que la relación huésped-parásito es más compleja en comparación con los ensayos realizados in vitro.

En los ensayos de actividad de lectina se observó

que la clona C₉₁₉ tenía una actividad de lectina muy baja comparado con la actividad que presentó la cepa HM1:IMSS. Esta escasa actividad de lectina que presentó la clona C₉₁₉, parece indicar la falta de un receptor inhibible por N-acetil-D-galactosamina es la causa de la deficiencia de esta clona para adherir tanto eritrocitos como células de la línea CHO. Las clonas C₉₃ y L-6, Vir⁻, presentaron una actividad de lectina ligeramente menor a la que presentó la cepa HM1:IMSS. Sin embargo, esta deficiencia parece poca para explicar la diferencia en virulencia que existe entre la cepa HM1:IMSS y estas clonas. Este resultado sugiere que no existe una relación directa entre la actividad de lectina y la virulencia amibiana como habían postulado otros autores (Ravdin y col, 1985).

Por otra parte, la actividad de lectina parece participar en la adhesión de los trofozoítos a eritrocitos, pues sólo las mutantes que adhieren eficientemente eritrocitos tuvieron una eficiente actividad de lectina (clonas C₉₃ y L-6). Así, la actividad de lectina, igual que la adhesión son eventos necesarios para que se ex-

prese la virulencia de E. histolytica pero por si mismas no son suficientes para la expresi3n de la agresividad.

CONCLUSIONES

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

- 1) Las mutantes de E. histolytica Dmt^R presentaron 2 grupos con diferentes alteraciones responsables del fenotipo:
 - a) Alteraciones a nivel de la membrana plasmática.
 - b) Alteraciones a nivel de la maquinaria de síntesis de proteínas.
- 2) La membrana plasmática de la amiba juega un papel importante en la virulencia, ya que mutantes con alteraciones a nivel de la membrana mostraron ser deficientes en adhesión, fagocitosis y virulencia.
- 3) La clona C₉ es una población altamente homogénea ya que sólo con la ayuda de un mutágeno se pudieron

- aislar las mutantes Fag⁻.
- 4) Como la mayoría de las mutantes Vir⁻ son eficientes para crecer en agar semisólido, parece no existir relación entre esta propiedad y la virulencia ambiental.
 - 5) La fagocitosis es un factor de virulencia primario, pues todas las mutantes Fag⁻ fueron deficientes en virulencia.
 - 6) La adhesión y la "actividad de toxina" son factores de virulencia secundarios, ya que su expresión parece ser necesaria para que se exprese la virulencia, pero por sí mismas no son responsables de la agresividad del parásito.
 - 7) El efecto citopático sobre monocapas celulares en cultivo y los ensayos de interacción con células de la línea CHO pueden ser utilizados como modelos para medir la virulencia in vitro.
 - 8) Los polimorfonucleares parecen tener un papel muy

importante en el organismo durante la infección de E. histolytica.

- 9) Se sugiere la existencia de más de un tipo de receptor en la superficie amibiana que median la adhesión a las células blanco, pues existen clones que adhieren eficientemente eritrocitos pero no células de la línea CHO.

- 10) La actividad de lectina inhibible por N-acetil-D-galactosamina, como es una medida indirecta de adhesión, es necesaria pero no suficiente para que se exprese la virulencia amibiana.

REFERENCIAS

- Barker, D.C. y Swales, L.S. (1972). Characteristics of ribosomes during differentiation from trophozoites to cyst in axenic Entamoeba sp. *Cell Differ.* 1: 297.
- Beale, G.H., Carter, R. y Walliker, D. (1978). Genetics in: Rodent malaria. Editor: R. Killick-Kendrick. Academic Press, New York. 213.
- Bench-Hansen, N.T., Till, J.I. y Ling, V. (1976). Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells; cross-resistance and collateral sensitivity. *J. Cell Physiol.* 88:23.
- Bos, H.J. y Van der Eijk, A. (1980). Serum-inhibited toxicity of Entamoeba histolytica. *Arch. Invest. Med. (Méx)*. 11 (Supl. 1): 135.
- Bracha, R., Kobilier, D. y Mirelman, D. (1982). Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of Entamoeba histolytica. *Infect. Immun.* 36: 369.

Bracha, P. y Mirelman, D. (1984). Virulence of Entamoeba histolytica trophozoites. Effects of bacteria, micro-aerobic conditions, and metronidazole. J. Exp. Med. 160: 353.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analy. Biochem. 72: 248.

Brandt, H. y Pérez-Tamayo, R. (1970). Amibiasis. La Prensa Médica Mexicana. México. pp. 392.

Carter, R. (1978). Studies on enzyme variation in the murine malaria parasites Plasmodium berghei, P. yoelii, P. vinckei and P. chabaudi by starch gel electrophoresis. Parasitol. 76: 241.

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

Diamantstein, T.J., Klos, M., Gold, D. y Hahn, H. (1981). Interaction between Entamoeba histolytica and immune system. I. Mitogenicity of Entamoeba histolytica, extracts for human peripheral T Lymphocytes. J. Immunol. 126: 2084.

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

Eagle, H. (1959) Aminoacid metabolism in mammalian cell cultures. Science 130: 432.

García-Rivera, G., Sánchez, T., Orozco, E. y Guarneros, G. (1982). Aislamiento de clonas de E. histolytica deficientes en adhesión a eritrocitos humanos. Arch. Invest. Med. (Méx). 13 (Supl. 3): 129.

Garvey, J.S., Cremer, N.E. y Sussdorf, D.H. (1977). Reagents. Cap. IV En: Methods in immunology. Editor: W.A. Benjamin, Inc. Reading. Massachusetts, 3a. edición.

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

Grollman, A.P. (1966). Structural basis for inhibition of protein synthesis by emetine and cicloheximide based on an analogy between ipecac alkaloids and glutarimide antibiotics. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 56: 1867.

Gupta, R.S. y Siminovitch, L. (1976). The isolation and preliminary characterization of somatic cell mutants resistant to the protein synthesis inhibitor-emetine. Cell 9: 213.

Gupta, R.S. y Siminovitch, L. (1977). The molecular basis of emetine resistance in Chinese Hamster Ovary cells: Alteration in the 40S ribosomal subunit. Cell 10: 61.

Guerrant, R.L., Brush, J., Ravdin, J.I., Sullivan, J.A. y Mandell, G.L. (1981). Interaction between Entamoeba histolytica and human polymorphonuclear neutrophils.

J. Infect. Dis. 143: 83.

Hernández, F.C. (1985). Intercambio genético en Entamoeba histolytica. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Genética). Departamento de Genética y Biología molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Hoeijmakers, J.H.J., Fresch, A.C.C., Bernards, A., Borst, P. y Cross, G.A.M. (1980). Novel expression-linked copies of the genes for variant surface antigens in trypanosomes. Nature 284: 78.

Hutchinson, D.F. (1963). Cross resistance and collateral sensitivity studies in cancer chemotherapy. Adv. Cancer Res. 7: 235.

Joyner, L.D. y Norton, C.C. (1975). Transferred drug resistance in Eimeria maxima. Parasitol. 71: 385.

Kettis, A.A. y Suntqvist, K.G. (1982). Activation of lymphocytes

from healthy donors of patients with amebiasis by extracts of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx). 13 (Supl. 3): 245.

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

Kobiler, D. y Mirelman, D. (1984). Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. Infect. Immun. 29: 221.

Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Ieedale, G.F., Leoblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. y Wallace, F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. J. Protozool. 27: 37.

Iushbaugh, W.B., Kairella, A.B., Cantey, J.R., Hofbauer, A.F., Pittman, J.C. y Pittman, F.E. (1978). Citotoxicity of a cell-free extract of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx). 9 (Supl. 1): 233.

Lynch, E.C., Rosenberg, I.M. y Gitler, C. (1982). An ion-channel forming protein produced by Entamoeba histolytica. EMBO J. 1: 801.

Martínez-Palomo, A. (1982). The biology of Entamoeba histolytica. Research Studies Press. Great Britain. pp 161.

Mattern, C.F.T., Keister, D.B. y Caspar, P.A. (1978). Experimental amebiasis III. A rapid in vitro assay for virulence of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27: 882.

Mattern, C.F.T., Keister, D.B. y Natovitz, P.C. (1980). Entamoeba histolytica "toxin" fetuin neutralizable and lectin-like. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39: 26.

Mora-Galindo, J., Martínez-Paloma, A. y Chávez, B. (1978). Interacción entre Entamoeba histolytica y el epitelio cecal del cobayo. Arch. Invest. Med. (Mex). 9 (Supl. 1): 261.

Muñoz, M.L., Calderón, J. y Rojkind, M. (1982). The collagenase of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 155: 42.

Muñoz, M.L., Rojkind, M., Calderón, J., Taniyoto, M., Arias-Negrete, S. y Martínez-Palomo, A. (1984). Entamoeba histolytica: Collagenolytic activity and virulence. J. Protozool. 31: 468.

Noble, E.R. y Noble, G.A. (1976). The biology of animal parasites. Editor: Lea & Febiger. Philadelphia. 60.

Novikoff, A.B., Novikoff, P.M., Davis, C. y Quintana, N. (1972). Studies in microperoxisomes II. A cytochemical method for light and electron microscopy. J. Histochem. Citochem. 20: 1006.

Olguín, T. (1984). Estudio comparativo de la fagocitosis en dos clones de Entamoeba histolytica de diferente virulencia. Tesis para obtener el título de licenciado en Biología. ENEP-Iztacala, UNAM.

Orozco, E., Martínez-Palomo, A. y López-Pevilla, R. (1978). Un modelo in vitro para el estudio cuantitativo de la virulencia de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx). 9 (Supl. 1): 257.

Orozco, E., Martínez-Palomo, A. y Guarneros, G. (1980). Virulencia y propiedades de superficie de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx). 11 (Supl. 1): 153.

Orozco, E. (1981). Virulencia y propiedades de superficie de Entamoeba histolytica. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Orozco, E., Martínez-Palomo, A., González-Robles, A., Guarneros, G. y Mora-Galindo, J. (1982). Las interacciones lectina-receptor median la adhesión de E. histolytica a células epiteliales. Relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. Arch. Invest. Med. (Méx). 13 (Supl. 3): 159.

- Orozco, E., Guarneros, G. y Martínez-Palomo, A. (1982). Clonas de E. histolytica deficientes en fagocitosis presentan deficiencia en virulencia. Arch. Invest. Med. (Méx). 13 (Supl. 3): 137.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A. y Sánchez, T. (1983). Entamoeba histolytica phagocytosis as virulence factor. J. Exp. Med. 158: 1511.
- Orozco, E., Suárez, M.E. y Sánchez, T. (1985). Different adhesion, phagocytosis and virulence in clones from Entamoeba histolytica, strain HMI:IMSS. I. J. Parasitol. (En prensa).
- Orozco, E., Hernández, F.C. y Rodríguez, M.A. (1985). Isolation and characterization of Entamoeba histolytica mutants resistant to emetine. Molec. Biochem. Parasitol. 15:49.
- Padua, R.A. (1981). Plasmodium chabaudi: genetics of chloroquine-resistance. Exp. Parasitol. 52: 419.
- Pfefferkorn, L.C. y Pfefferkorn, E.R. (1980). Toxoplasma

gondii: genetics recombination between drug resistant mutants. Exp. Parasitol. 50: 305.

Ravdin, J.I., Kroft, B.Y. y Guerrant, R.L. (1980). Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152: 377.

Ravdin, J.I. y Guerrant, R.L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J. Clin. Invest. 68: 1305.

Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Salata, R.A., Guerrant, R. L. y Hewlett, E.L. (1985). The N-Acetyl-D-Galactosamine inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. (En prensa).

Rosario, J.E. (1976). Genetics of chloroquine-resistance in malaria parasites. Nature 261: 585.

Salata, R.A. y Ravdin, J.I. (1985). The N-Acetyl-D-Galactosamine inhibitable lectin of Entamoeba histolytica. II. Mitogenic activity for human lymphocytes. J. Infect.

Dis. (En prensa).

Sepúlveda, B. (1975). Amibiasis. (Conferencia Internacional sobre Amibiasis). Editores: B. Sepúlveda y L.S. Diamond. Centro de Estudios sobre Amibiasis. México. 33.

Smith, J.W., McQuay, R.M., Ash, L.R., Melvin, D.M., Orihel, T.C. y Thompson, J.H. (1979). Diagnostic medical parasitology intestinal protozoa. American Society of Clinical Pathologist, Education Products Division. USA.

Suárez, M.E. (1983). La fagocitosis como factor de virulencia en Entamoeba histolytica. Tesis para obtener el título de licenciado en Biología. ENEP-Iztacala, UNAM.

Svhla, G. y Baker, D.C. (1961). Ultraviolet microscopy of Entamoeba invadens. J. Parasitol. 47: 577.

Takeuchi, A. y Phillips, B.P. (1976). Electron microscope studies of experimental Entamoeba histolytica infection in the guinea pig II. Early cellular and vascular changes accompanying invasion of the lamina propia. Virchows. Arch.

B. Cell Path. 20: 1.

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

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

Walliker, D., Sanderson, A., Yorli, M. y Hargreaves, B. J. (1976). A genetic investigation of virulence in rodent malaria parasites. Parasitol. 72: 183.

Young, J.D.F., Young, T.M., Lu, L.P., Unkeless, J.G. y Cohn, Z.A. (1982). Characterization of membrane pore-forming protein from Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 156: 1677.

APENDICE

MEDIO 56/2

(MEDIO MINIMO PARA CRECIMIENTO DE BACTERIAS)

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

pH 7.4 en 1000 ml de agua destilada.

MEDIO DE MANTENIMIENTO

(PARA AMIBAS)

Tris HCL	6.056 g
KCL	0.890 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.626 g
NaCl	1.462 g
CaCl_2	0.22 g
Acido ascórbico	1.76 g
Cisteína	0.78 g

pH 7 en 1000 ml de agua bidestilada.

MEDIO TYI-S-33

Biosate	30.0 g
Dextrosa	10.0 g
NaCl	2.0 g
KH_2PO_4	0.6 g
Cisteína	1.0 g
K_2HPO_4	1.0 g
Citrato férrico	0.0236 g
Acido ascórbico	0.2 g

pH 6.8 en 820 ml de agua bidestilada.

SOLUCION DE ALSEVER

Dextrosa	20.5 g
Citrato de sodio	8.0 g
Acido cítrico	0.55 g
NaCl	4.2 g

pH 6.1 en 1000 ml de agua bidestilada.

SOLUCION SALINA AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

NaCl 8.0 g

KCl 0.2 g

Na_2HPO_4 1.15 g

KH_2PO_4 0.2 g

pH 7.3 en 1000 ml de agua destilada.