

11261 11/24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Facultad de Medicina
Unidad de Posgrado

"CARACTERIZACION DE Entamoeba histolytica
EN CULTIVOS POLIXENICOS, POR PATRONES ISOENZIMATICOS,
CITOLISIS DEPENDIENTE DE CONTACTO Y PATRONES DE RESTRICCION
EN AISLADOS DE PORTADORES ASINTOMATICOS Y PACIENTES SINTOMATICOS"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS

que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biomédicas,
especialidad Parasitología, presenta:

RICARDO PEREZ FUENTES

México, D.F.
1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Lista de abreviaturas	vii
Lista de cuadros y tablas	ix
Lista de figuras	x
Agradecimientos	xi
Resumen	xii

1. INTRODUCCION

1.1. Antecedentes	
1.2. Biología de <u>Entamoeba histolytica</u>	
1.3. Mecanismos de patogenicidad de <u>E.histolytica</u>	
1.4. Marcadores de Patogenicidad	
1.5. Patrones de restricción del DNA en protozoarios	

2. JUSTIFICACION

3. HIPOTESIS

4. OBJETIVOS

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Material biológico

- a. Cepas axénicas de E.histolytica
- b. Cepas polixénicas de E.histolytica

6.2. Cultivos

- a. Cultivo axénico de trofozoitos de E.histolytica
 - 1. Medio TYI-S-33
- b. Cultivos polixénicos de trofozoitos de E.histolytica
 - 1. Medio de Robinson modificado
 - 2. Medio de Boeck y Dbrolav modificado
- c. Bacterias asociadas al cultivo polixénico
- d. Cultivo de células MDCK

6.3. Separación de trofozoitos de E.histolytica de la microbiota asociada en cultivo polixénico

- a) Por adherencia al vidrio
- b) Separación por gradiente de Percoll
- c) Reducción de almidón del medio de cultivo

6.4. Determinación de patrones isoenzimáticos

- a) Obtención de los extractos amibianos
- b) Electroforesis de los extractos amibianos

6.5. Actividad lítica de trofozoitos de E.histolytica en monocapa de células epiteliales MDCK

6.6. Extracción y purificación del DNA amibiano

- a) Cultivos axénicos
- b) Cultivos polixénicos

- 6.7. Extracción del DNA de la microbiota asociada al cultivo polixénico
- 6.8. Digestión del DNA amibiano con la enzima de restricción EcoR1 y análisis en geles de agarosa al 1%
- 6.9. Transferencia del DNA amibiano digerido e hibridación con DNA total de HM:1-IMSS marcado con ³²P

7. RESULTADOS

- 7.1. Cultivo polixénico de aislados de E.histolytica
- 7.2. Separación amibas/microbiota asociada al cultivo
- 7.3. Análisis del patrón isoenzimático (Zimodemo)
- 7.4. Actividad lítica de los aislados de E.histolytica en monocapa de células MDCK
- 7.5. Análisis del patrón de restricción del DNA amibiano ...

8. DISCUSION

9. CONCLUSIONES

10. ANEXOS

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

LISTA DE ABREVIATURAS

a.a.	aminoácidos
abe	Agua bidestilada estéril
A	Amperios
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
°C	Grados centigrados
CHO	Células de ovario de hámster chino
DNA	Acido desoxirribonucléico
D.O.	Densidad óptica
dATP	2'-Desoxiadenosina 5'-trifosfato
dGTP	2'-Desoxiquanosina 5'-trifosfato
dTTP	2'-Desoxitimidina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitosina 5'-trifosfato
<u>E. histolytica</u>	<u>Entamoeba histolytica</u>
<u>E. invadens</u>	<u>Entamoeba invadens</u>
<u>E. laredo</u>	<u>Entamoeba laredo</u>
<u>E. coli</u>	<u>Escherichia coli</u>
EDTA	Acido etilendiamino-tetracético
g	Gravedades
g	Gramos
Kb	Kilo bases
KDa	Kilo daltones
kpb	kilopares de bases
lb	Libras
M	Molar
mA	Miliamperios

mg	Miligramos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
FBS	Solución balanceada de fosfatos
pb	Pares de bases
PEG	Polietilenglicol
P.M.	Peso molecular
p/v	Peso/volumen
RNA	Acido ribonucléico
RNA _m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
s	Coefficiente de sedimentación
SDS	Dodecil sulfato de sodio
sol.	solución
TYI-S-33	Medio de cultivo axénico
µg	Microgramos
µl	Microlitros
u.v.	Ultravioleta
V	Volts
v/v	Volumen a volumen

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Caracterización y tipo de zimodemo de los aislados de Entamoeba histolytica en cultivo polixénico ...

TABLA 2. Correlación entre caracterización por criterios clínicos y criterios experimentales in vitro de cepas polixénicas de Entamoeba histolytica

TABLA 3. Correlación entre origen y caracterización experimental in vitro de cepas axénicas de Entamoeba histolytica

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo biológico de Entamoeba histolytica

FIGURA 2. Mecanismos propuestos para explicar la
patogenicidad por Entamoeba histolytica

FIGURA 3. Estrategia experimental

FIGURA 4. Esquema del procedimiento para determinar la
actividad lítica de trofozoítos sobre monocapa
confluente de células MDCK

FIGURA 5. Transferencia del DNA digerido con EcoR1 a filtro
Nytran e hibridación con DNA ³²P-HM:1-IMSS

FIGURA 6. Rendimiento de Entamoeba histolytica en cultivo
polixénico por diversos procedimientos de
separación

FIGURA 7. Efecto citopático en monocapa confluente de
células MDCK

FIGURA 8. DNA de cepas axénicas y polixénicas de Entamoeba
histolytica cortado con EcoR1

FIGURA 9. Autorradiografía del DNA de cepas axénicas y polixénicas cortado con EcoRI e hibridado con DNA ³²P-HM:1-IMSS

RESUMEN

RESUMEN.

Se adaptaron seis aislados de E.histolytica obtenidos de portadores y pacientes con amibiasis invasora al cultivo de Robinson modificado (sin base de agar). Se diseñaron procedimientos de separación amibas/microbiota asociada por adherencia al vidrio, centrifugación diferencial y por gradientes de percoll. Se caracterizaron los trofozoitos de E.histolytica por patrones isoenzimáticos (Zimodemos), citólisis dependiente de contacto y patrones de restricción del DNA.

Los aislados HM:2, HM:43 y HM:44 provenientes de portadores asintomáticos, mostraron ZNP; el aislado HM:4 obtenido de un paciente sintomático mostró ZP; el aislado HM:46 obtenido de un portador, mostró un ZP y el aislado HM:50 obtenido de un paciente sintomático mostró un ZP. Los aislados HM:2, HM:43, HM:44 y HM:50 no presentaron efecto lítico sobre monocapas de células MDCK. Por otra parte, los aislados HM:4 y HM:46 sí manifestaron actividad citolítica. Se emplearon como controles de actividad citolítica positiva las cepas HM:1-IMSS, HM:38-IMSS y HK:9-NIH y como controles negativos la cepa Laredo, el medio de cultivo celular y la microbiota asociada al cultivo polixénico. El patrón de restricción del DNA amibiano resultante del corte con la enzima EcoR1 mostró la presencia de polimorfismo del DNA en los sitios de acción de la endonucleasa. Se observó en la autorradiografía que los aislados HM:2, HM:4, HM:44, HM:46 y HM:50 tuvieron un doblete común de 0.7 y 0.9 Kbp presentes en las cepas axénicas HM:1-IMSS, HM:38-IMSS y HK:9-NIH. Este doblete no se observó en

la cepa Laredo.

El patrón isoenzimático identificado como ZNP y la ausencia de efecto citolítico en los aislados HM:2, HM:43 y HM:44 correlacionaron con el estado clínico de portador de donde fueron obtenidas. El zimodemo patógeno y el efecto citolítico observado con los aislados HM:4 y HM:50 obtenidos de pacientes sintomáticos también mostraron correlación. Sin embargo, en el aislado HM:46 que provino de un portador asintomático con serología y rectosigmoidoscopia negativas, ZNP (realizada en 1987), tuvo ZP y mostró efecto citolítico.

El polimorfismo en los patrones de restricción del DNA, no identificó un patrón característico en aislados de E.histolytica que permitiera diferenciar cepas patógenas de no patógenas, sin embargo, puede ser de significancia taxonómica e indicar que los seis aislados pertenecían a la especie E.histolytica ya que mostraron el doblete común de 0.7 y 0.9 Kbp característico de esta especie (ausente en las especies no-histolytica, Batthacharya y col, 1988) para cepas mantenidas en cultivos axénicos.

I. INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES

Amibiasis es la infección en el humano debida al protozoario intestinal Entamoeba histolytica. Esta especie usualmente vive como comensal en la luz del colon pero puede invadir la mucosa intestinal produciendo disenteria o ameboma. Puede diseminarse por via sanguinea y causar lesiones extraintestinales, particularmente en el higado ocasionando absceso hepatico que puede romperse invadiendo peritoneo, pleura o pericardio (Martinez-Palomo, 1986).

La distribución de la infección luminal con este parásito, determinada por la presencia de quistes en heces abarca todas las latitudes, no obstante la prevalencia es mayor en zonas tropicales y subtropicales (Sargeant y col., 1982).

La amibiasis invasora es un problema de salud grave en ciertas áreas de Africa, Asia y América Latina donde la mayor incidencia se observa en personas de nivel socioeconómico bajo, debido a las malas condiciones higiénicas en que viven, falta de saneamiento y educación deficiente en combinación con la presencia de cepas de E. histolytica altamente patógenas (Sepúlveda, 1986).

Cálculos estimativos sugieren que existen unos 500 millones de individuos infectados con E. histolytica en el mundo. En el 90%, el parásito permanece sin causar daño en el intestino del huésped, estos casos son descritos como portadores asintomáticos y sólo en un 10%, bajo condiciones aún no elucidadas, las amibas invaden los tejidos del huésped (Walsh, 1986).

La controversia al carácter patógeno de E.histolytica se inicia con la primera descripción clínica de amibiasis realizada por F.A. Lesch en 1873, la cual finaliza mencionando que la presencia de las amibas podrían prolongar y agravar el cuadro de disentería, pero no ser el agente causal de esta entidad. Esta conclusión se basó principalmente en las diferencias clínicas observadas entre su paciente y un perro inoculado experimentalmente (Lesch intentó reproducir la enfermedad inoculando 4 perros, por vía oral y rectal, con heces de su paciente, pero sólo en un perro se presentó un cuadro semejante), ya que mientras el paciente manifestó fiebre y postración severa, el animal sólo presentó un cuadro leve y sin complicaciones (Guarner, 1989).

En 1896, Stephanos Kartulis publicó los resultados de 150 casos de disentería con presencia, en las heces de los pacientes, de amibas semejantes a las descritas por Lesch, reproduciendo además la infección amibiana en gatos. En 1877 Roberto Koch halló también estas amibas en capilares hepáticos cercanos a abscesos y en cortes histológicos de úlceras colónicas, con lo cual puso en claro, la relación etiológica entre disentería y absceso hepático. En el mismo año, Hlava en Checoslovaquia encontró amibas en casos de disentería e inoculó con heces de pacientes, abundantes en amibas, a varias especies animales y tuvo éxito en 4 gatos, con lo cual se confirmó el poder patógeno de estos parásitos. En 1891 Councilman y Lafleur médicos del Hospital Johns Hopkins en Baltimore reportaron casos de disentería con amibas en las heces y elaboraron una excelente monografía de 150

páginas sobre amibiasis intestinal y hepática que aún constituye uno de los mejores estudios realizados en el campo de la enfermedad. En 1893 Quincke y Roos confirman la existencia de más de una especie de amiba parásita en el intestino humano describiendo además el ciclo evolutivo y la transformación de los trofozoítos en quistes, demostrando que éstos son la forma infectante. En 1894 Kruse y Pascuale produjeron disentería en gatos inoculándolos con pus de absceso hepático, bacteriológicamente estéril, demostrando la capacidad de las amibas para producir lesiones sin la presencia de otros gérmenes. En 1903 Huber precisa las características que permiten diferenciar quistes de E.histolytica (Schaudinn, 1903) de quistes de E.coli. En 1904 Musgrave y Clerg afirman que todas las especies de amibas que habitan en el intestino humano son o pueden ser patógenas. Estos investigadores cultivaron algunas especies de amibas y observaron casos de personas muertas a consecuencia de otras enfermedades pero presentaban lesiones amibianas típicas en colon, introduciendo el término amibiasis para designar a las infecciones amibianas independientemente de que fueran acompañadas o no con síntomas y lesiones. En 1913 Walker y Sillardts comprueban concluyentemente la no patogenicidad de E.coli y la patogenicidad de E.histolytica. Los detalles del ciclo de vida de los parásitos no se habían elucidado y otras especies y géneros de amibas se encontraron viviendo como comensales en el aparato gastrointestinal y E.histolytica frecuentemente se halló en pacientes que carecían de síntomas y lesiones tisulares.

Se intentó reconocer cepas de amibas no patógenas por diferentes métodos, principalmente por aspectos morfológicos. Emile Brumpt (1925) denomina a E. dispar como una cepa caracterizada por su inocuidad, comparándola con la morfológicamente indistinguible pero patógena E. dysenteriae. Hoare en 1958 nombra a la forma diminuta de E. histolytica como una amiba no invasora. En 1961, Craig y Faust enuncian que la presencia y severidad de las lesiones probablemente dependía de la virulencia de las cepas (Martínez-Baez, 1976).

Sin embargo a más de 100 años de la primera descripción clínica de amibiasis hecha por Fedor A. Lesh, el carácter patógeno de E. histolytica no se encuentra bien definido. Hasta el momento se desconoce la causa de la frecuencia relativamente baja de enfermedad. Dos hipótesis intentan explicar el comportamiento invasor o comensal de la interacción entre parásito y huésped. La primera enuncia la existencia de una sola especie de E. histolytica con capacidad para producir daño (Patogenicidad) en grado variable (Virulencia) y cuya expresión dependería de las condiciones microambientales. La segunda propone que existen 2 especies diferentes de parásitos indistinguibles morfológicamente, una patógena con virulencia variable y otra no patógena responsable de la amibiasis asintomática (Martínez-Palomo, 1986).

1.2. BIOLOGIA DE E.histolytica

E.histolytica es un parásito protozoario perteneciente al filum Sarcomastigofora, clase Lobosea, orden Amebida, familia Endamoebidae, género Entamoeba (Levine, 1980). Presenta dos estadios: el trofozoito y el quiste. El trofozoito o forma vegetativa, es una célula pleomórfica, caracterizada por las propiedades dinámicas de su membrana plasmática que le permiten llevar a cabo procesos de fagocitosis, pinocitosis, redistribución de ligandos externos y de adherencia. Al desplazarse emite prolongaciones de su citoplasma denominados lobopodios.

El trofozoito mide de 7 a 40 μm de diámetro aproximadamente, dependiendo de la especie. Posee actina y estructuras parecidas a microfilamentos, no se han encontrado microtúbulos en el citoplasma pero sí en el núcleo (Solís y col., 1990). Carece de mitocondrias, lisosomas, Aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, centriolos y su citoesqueleto no se observa típicamente organizado. Para su crecimiento requiere de un pH de 6.0-6.5 y medios de cultivo complejos, la fuente de energía la obtiene por la degradación de glucosa, no posee citocromos ni la ruta metabólica clásica de Embden-Meyerhof.

El contenido total de ácidos nucleicos en los trofozoitos ha sido estimado en 0.5 pg por núcleo para E.histolytica cepa HM:1-IMSS y el tamaño del genoma de 4.0×10^6 (Gelderman y col., 1971; López-Revilla y col., 1978). El 25% del genoma total de E.histolytica al parecer se organiza en nucleosomas con proteínas

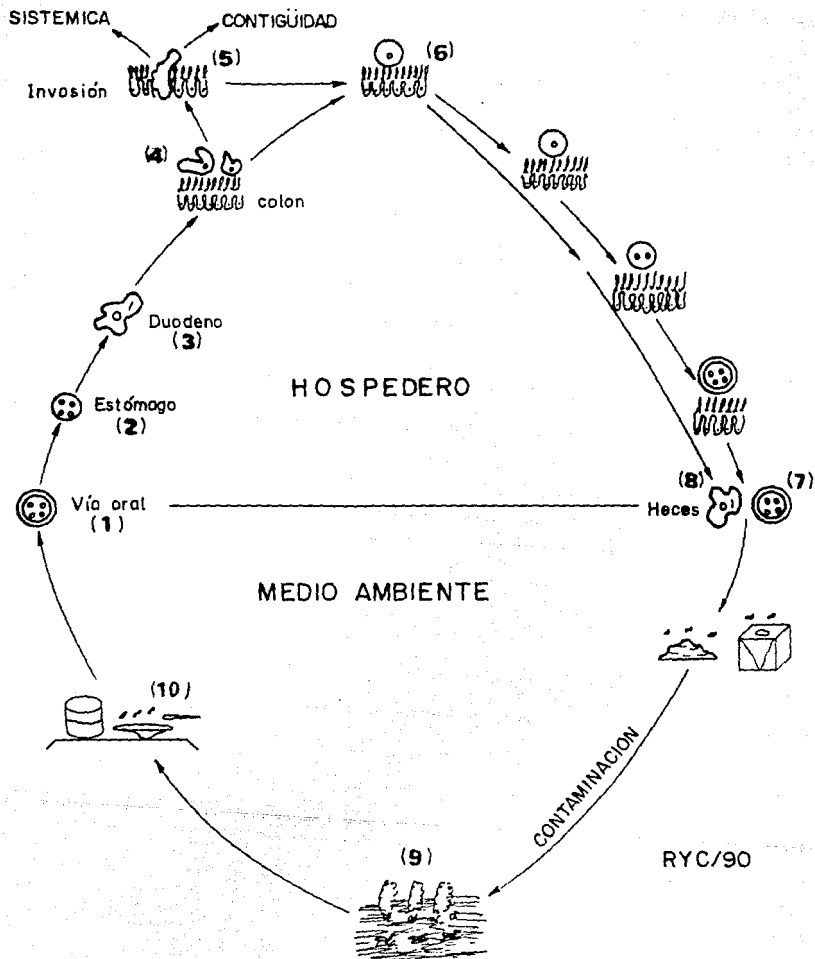
básicas que difieren de las histonas típicas de eucariontes superiores (Torres-Guerrero, 1990).

Con respecto a la organización y regulación de la expresión de los genes de este parásito existe poca información. En 1988 Battacharya y Diamond publican el patrón de restricción del genoma de E.histolytica empleando las enzimas EcoRI y HindIII. Huber y col. (1989) demuestran la presencia de una molécula de DNA ribosomal circular que contiene 2 regiones invertidas de 5.2 kbp de longitud, las cuales codifican para los RNAs ribosomales. Las secuencias repetidas que flanquean estas regiones invertidas pueden ser utilizadas en el diagnóstico y diferenciación de cepas de amibas (Estévez y col., 1990; Samuelson y col., 1989). El único gen descrito de E.histolytica es el gen de actina (Edman y col., 1987; Huber y col., 1987).

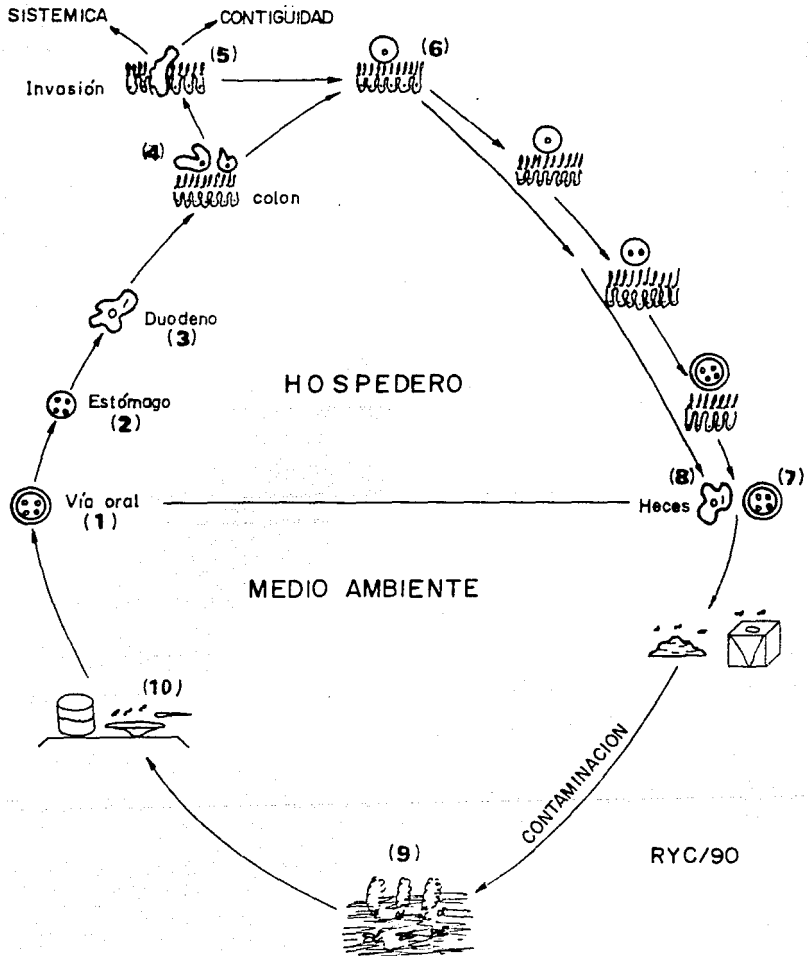
El quiste, la forma infectante, de menor tamaño que el trofozoito (8-20 μ m), está formado por una pared celular constituido por quitina, membrana plasmática, citoplasma y 4 núcleos característicos con endosoma central (Martínez-Palomo, 1980).

La transmisión de la amibiasis entre los huéspedes humanos (Figura 1), ocurre cuando los quistes son excretados al medio ambiente y son ingeridos por otros individuos al consumir alimentos contaminados con éstos. Los quistes al llegar al nivel del estómago, pierden su cubierta de quitina y sufren varias divisiones nucleares, dando lugar a metaquistes que escapan de cada quiste. Esta pequeña amiba alcanza la luz intestinal, en donde aumenta de tamaño y se reproduce asexualmente por división

CICLO BIOLÓGICO DE Entamoeba histolytica.



CICLO BIOLÓGICO DE Entamoeba histolytica.



binaria originando 8 trofozoítos mononucleados. Estos pueden permanecer en la luz del intestino del huésped sin producir daño aparente y después de varias divisiones su motilidad disminuye, se reduce su material citoplasmático (estado prequístico) tienden a redondearse y se enquistan dando lugar a los quistes tetranucleados (estado de portador asintomático).

Por otro lado, los trofozoítos, bajo circunstancias no bien comprendidas, pueden invadir la mucosa colónica produciendo disenteria o diseminarse a través de la circulación originando lesiones extraintestinales (amibiasis invasora) (Kudo, 1969).

1.3. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

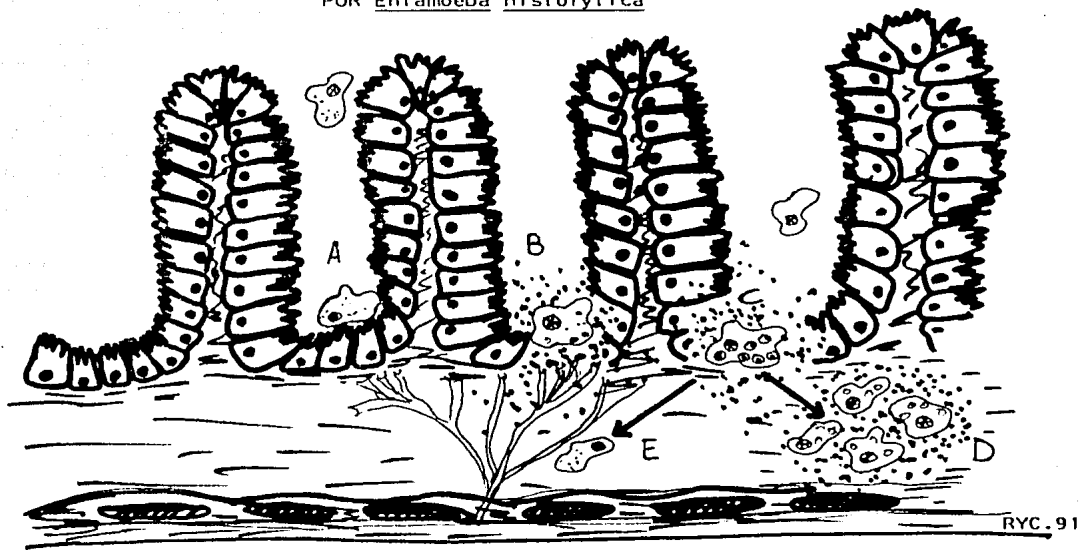
Los mecanismos de patogenicidad de los trofozoitos de E.histolytica que les permiten dañar células, producir úlceras intestinales y necrosis extensa no han sido bien elucidados, pero se piensa que es un proceso multifactorial (Meza y col., 1989). Se proponen varios eventos que con fines descriptivos han sido divididos en: 1. adhesión, 2. citólisis dependiente de contacto, 3. fagocitosis y degradación intracelular, 4. invasión por contigüidad y 5. invasión por vía sistémica (Martínez-Palomo, 1987) (Figura 2).

1. Adhesión: Los trofozoitos de E.histolytica tienen la propiedad de adherirse rápidamente a monocapas de células en cultivo y a sustratos inertes como plástico o vidrio. La adhesión de las amibas a las superficies inertes está dada por mecanismos inespecíficos, mientras que la adhesión a células epiteliales está mediada por mecanismos específicos, los cuales requieren de reconocimiento de moléculas en la superficie del parásito (adhesinas) y moléculas en la superficie de las células blanco (receptores) (Martínez-Palomo, 1986).

Se postula la participación activa de proteínas que unen carbohidratos con propiedades parecidas a las lectinas vegetales en numerosos fenómenos de adhesión (Dazzo y Brill, 1977). En E.histolytica se han descrito dos actividades de lectina. Una de ellas tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos de diferentes especies, incluyendo los de humano y su actividad es inhibible

FIG. 2 MECANISMOS PROPUESTOS PARA EXPLICAR LA PATOGENICIDAD

POR Entamoeba histolytica



- A. Reconocimiento y adherencia
- B. Citólisis
- C. Fagocitosis y degradación intracelular
- D. Invasión por contigüidad
- E. Invasión por vía sistémica

por oligómeros de N-acetilglucosamina (Kobiler y Mirelman, 1980). La segunda de ellas fue detectada en extractos crudos amibianos y en trofozoitos vivos (Ravdin, 1985) y es inhibida por N-acetilgalactosamina.

Entre las moléculas que se han visto involucradas en la adhesión de los trofozoitos de E.histolytica a la célula blanco se encuentran: Las lectinas amibianas inhibibles por N-acetilgalactosamina (Kobiler y Mirelman, 1980). La lectina de 170 kDa inhibible por N-acetil-D-galactosamina (Ravdin y col, 1985) que media la adherencia de E.histolytica a células CHO. La lectina de 220 kDa cuya actividad es inhibida por concentraciones micromolares de ácido hialurónico, quitina y quitatriosa (Rosales-Encina y col., 1987 y caracterizada por Meza y col., 1987). La lectina de 112 kDa, una glicoproteína que se localiza en la superficie de los trofozoitos (Arroyo y Orozco, 1986).

2. Citólisis dependiente de contacto: Estudios microcinematográficos han mostrado que el efecto citoletal de E.histolytica es dependiente de contacto (Ravdin y col., 1980). No se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales los trofozoitos amibianos lisan las células blanco después de que éstas establecen contacto con el parásito. Pero se sabe que este efecto es dependiente de temperatura y es óptimo a 37°C (Ravdin y Guerrat, 1981). Aparentemente, la lisis de las células blanco requiere de la función de los microfilamentos amibianos (Ravdin y col., 1980), ya que las citocalasinas B y D (fármacos que tienen

la propiedad de interferir con la formación de los microfilamentos), inhiben el efecto citoletal amibiano sobre células blanco (Guerrant y col., 1981). La lisis de las células blanco también ha sido asociada con el flujo iónico en la membrana de la célula blanco y dentro de la amiba ya que se encontró que dos agentes bloqueadores de canales de sodio y calcio (verapenil y bepridil) inhiben la citólisis de células CHO por amibas. Estos resultados indicaron que el flujo transmembranal de calcio, en la amiba y en la célula blanco, está involucrado en la actividad litica de los trofozoítos de E.histolytica (Ravdin y col., 1982). El papel del calcio en este evento se confirmó cuando se observó que dos agentes quelantes de calcio, EDTA y EGTA, inhibieron el efecto citolítico del parásito sobre células blanco adheridas a él (Ravdin y col., 1985). La fosfolipasa A, una fosfolipasa dependiente de calcio, cuya actividad está asociada a la membrana plasmática de los trofozoítos, también podría ser importante en la actividad citolítica de E.histolytica (López-Revilla y Said-Fernández, 1984). Long-Krug y col. (1985) encontraron que la citólisis de células CHO por los trofozoítos amibianos fué inhibida por antagonistas farmacológicos de la fosfolipasa A, tales como el inhibidor de Rosenthal, la quinacrina, la fosfatidilcolina y la hidrocortisona.

Otros factores que podrían participar en el mecanismo de agresión dependiente de contacto de E.histolytica sobre células blanco son: los lisosomas de superficie, la collagenasa y la proteína formadora de poro.

Lisosomas de superficie. En los trofozoítos de cepas patógenas de E.histolytica se han identificado estructuras vacuolares por la presencia de fosfatasa ácida y de otras enzimas. Se postuló que estas estructuras localizadas en las membranas de las amibas se hacían aparentes después de que el parásito establece contacto con las células blanco y que después de activarse por un mecanismo de membrana liberarían su contenido. Así los lisosomas de superficie podrían ser considerados como un mecanismo de agresión de E.histolytica (Eaton y col., 1969 y 1979; Proctor y Gregory, 1971). Sin embargo, por estudios de microscopia electrónica no ha sido posible revelar estructuras lisosomales asociadas a la membrana (Deas u Miller, 1977; González-Robles y Martínez-Palomo, 1983).

Colagenasa. Los trofozoítos de cepas patógenas de E.histolytica presentan actividad colagenolítica (Muñoz y col, 1982). La colagenasa amibiana es una metalo-proteinasa cuya actividad está asociada a la membrana de los trofozoítos y tiene mayor afinidad por colágena tipo I que por el tipo III. La actividad de esta enzima está ausente en los sobrenadantes de cultivo y sólo se detecta después del contacto de los parásitos con el sustrato de colágeno, lo cual sugiere que se requiere de contacto directo entre la amiba y el sustrato para que ocurra la digestión de la colágena, una proteína que se encuentra en grandes cantidades en la matriz extracelular de tejido conectivo. Por otra parte, midiendo la actividad colagenolítica en cepas de E.histolytica con diferente virulencia, se encontró que las cepas patógenas presentan mayor actividad de colagenasa que las cepas

no patógenas. Estos resultados sugieren que la actividad de la colagenasa puede jugar un papel importante en la invasión de los tejidos del huésped y por tanto en la expresión de la virulencia amibiana (Muñoz y col., 1984).

Proteína formadora de canales iónicos. Dos grupos de investigación han reportado la existencia de proteínas de la membrana plasmática de los trofozoítos amibianos capaces de formar poros en la membrana (PFM) de macrófagos y linfocitos (Lench y col., 1982; Young y col., 1982). Las PFM inducen una rápida despolarización de la membrana de las células mencionadas e inducen un rápido flujo de iones a través de la membrana de vesículas de fosfatidilcolesterol.

Las PFM son secretadas al medio sólo después de exponer las amibas al ionóforo de calcio A-23187, a Concanavalina A y a un lipopolisacárido de Escherichia coli. El papel de las PFM en la patogénesis de la amibiasis no está definido, pero se cree que pueden participar en el efecto citoletal del parásito mediante la inducción de los cambios de flujo iónico transmembranal detectados cuando las amibas entran en contacto con células blanco (Ravdin y col., 1985).

Productos de secreción de E.histolytica. Los trofozoítos de E.histolytica liberan al medio sustancias con actividad hidrolítica o proteolítica (Trissl y col., 1983; Keene y col., 1986). Se ha postulado que estas moléculas podrían tener gran importancia en la invasividad y en la patogenicidad del parásito al facilitarle la obtención de nutrientes a partir de los tejidos de su huésped, o bien mediando la destrucción tisular

observada en la amibiasis invasora (Takeuchi y Phillips, 1975; Lundblad y col., 1981; Gadasi y Kesler, 1983; Keene y col., 1986). Aún cuando no se cuenta con información que soporte un mecanismo de secreción o algún dato acerca de la cinética de liberación, si es claro que los trofozoítos de E.histolytica son capaces de secretar fosfatasa ácida, β -N-acetil-glucosaminidasa, α -glucosidasa, amilasas y en menor extensión esterasas (Lundblad y col., 1981; Trissl y col., 1983; Werries y col., 1983; Muller y col., 1988), así como también enzimas proteolíticas (Gadasi y Kessler, 1983, Lushbaugh y col., 1984; Keene y col., 1986), de las cuales sólo la proteasa neutra principal descrita por Keene y col. (1986) ha sido purificada y caracterizada.

3. Fagocitosis y Degradación intracelular: Después de que la citólisis dependiente de contacto ocurre, las amibas patógenas ingieren las células lisadas, aunque también pueden englobar células vivas (Martínez-Palomo, 1986). Trissl y col. (1986) encontraron que los trofozoítos de cepas patógenas ingieren más eritrocitos y con mayor rapidez que los trofozoítos de cepas no patógenas o con virulencia atenuada. Los trofozoítos de E.histolytica presentan 2 tipos de fagocitosis: una no específica por la cual los trofozoítos ingieren partículas como almidón, látex, hierro, etc. y cuyo contacto inicial puede estar mediado por fuerzas electrostáticas (Martínez-Palomo, 1986). El otro es un mecanismo altamente específico mediado por receptores de superficie llamados adhesinas, los cuales participan en el reconocimiento y unión de los trofozoítos a la célula blanco

(Arroyo, 1986). La especificidad de este segundo mecanismo se ha demostrado porque los trofozoitos amibianos muestran diferentes afinidades para ingerir eritrocitos de varias especies de mamíferos y diferentes cepas bacterianas (Ravdin y Guerrant, 1981; Bracha y col., 1982).

Una vez efectuada la fagocitosis, los trofozoitos internalizan la célula o partícula blanca mediante la fusión de la membrana plasmática con una vesícula lisosomal, dando lugar a la formación de una vesícula que contiene la célula o partícula blanca llamada fagosoma (Chapman-Andresen, 1977). Dentro del fagosoma, el material fagocitado entra en contacto con las enzimas digestivas amibianas. Entre las actividades proteolíticas que han sido descritas en E. histolytica podemos mencionar la actividad de hialuronidasa que se ha detectado en varias cepas amibianas (Mattern y col., 1978). Otras actividades enzimáticas incluyen: tripsina, pepsina, gelatinasa y enzimas que atacan caseína, fibrina y hemoglobina (Neal y col., 1960; Macgrath, 1969) todas las cuales son inhibidas por suero. Además, se han purificado parcial o totalmente enzimas proteolíticas a partir de extractos amibianos, los cuales han presentado actividad sobre azocol, azocaseína, hemoglobina y colágeno a valores de pH neutro o ácido (McLaughlin y Faubert, 1977; Lushbaugh y col., 1985; Luaces y Barret, 1988). Algunas de estas enzimas podrían participar en la digestión del material fagocitado.

4. Invasión por contigüidad: La característica más evidente de la patología de la amibiasis humana es la naturaleza destructiva de

las lesiones anatómicas. Aparentemente la enfermedad invasora producida por E.histolytica es debida a los mecanismos de adherencia que permiten la colonización de la mucosa intestinal del colon, seguida de la ruptura de las barreras intestinales por la secreción de toxinas y enzimas proteolíticas (descritas previamente), lo cual produce lisis de las células del epitelio intestinal y de las células inflamatorias del hospedero, resultando en ulceración colónica e invasión a planos profundos y/o a órganos distantes (Ravdin, 1989).

5. Invasión por vía sistémica: Una vez que los trofozoítos de E.histolytica alcanzan los vasos sanguíneos, estos pueden establecerse en cualquier órgano de la economía, preferentemente y debido a su relación con la vena porta en el lóbulo derecho del hígado. La necrosis tisular amibiana, gruesamente, es más licuante que coagulativa, lo cual explica la presencia de úlceras regulares en las lesiones intestinales y la cavitación de órganos parenquimatosos cuando éstos están involucrados, tales como hígado, pulmón o cerebro. Se acepta en general que las lesiones necróticas amibianas no son en realidad abscesos, debido a que no se cree que estén formados por la acumulación de leucocitos polimorfonucleares desintegrados y muertos con restos de tejidos y otros componentes de exudado inflamatorio sino más bien por los componentes del parénquima necrosado de hígado, pulmón o cerebro, los cuales son directamente destruidos por las amibas sin la participación de leucocitos polimorfonucleares (Pérez-Tamayo, 1990).

1.4. MARCADORES DE PATOGENICIDAD

Las primeras observaciones con microscopio de luz, reacciones de inmunofluorescencia (Kasuko-Kamashima, 1973) y microscopía electrónica (Treviño-García, 1973) no mostraron diferencias morfológicas que permitieran distinguir entre cepas de E.histolytica aisladas de portadores asintomáticos y pacientes con amibiasis invasora. Con este objetivo, grupos de investigación en amibiasis de México, Inglaterra, India, Estados Unidos, Alemania, Israel y otros países, han desarrollado diversos procedimientos in vitro e in vivo encontrando características bioquímicas y fisiológicas que identifican y correlacionan cepas patógenas y no patógenas de E.histolytica.

ZIMODEMOS: En particular el método mas ampliamente utilizado es el examen de los patrones electroforéticos de 4 sistemas de isoenzimas (glucosafosfatoisomerasa, fosfoglucomutasa, malato deshidrogenasa y hexocinasa). Este fue empleado por primera vez por Reeves y Bischoff (1968) para distinguir E.histolytica de otras especies amibianas. El análisis de amibas obtenidas de portadores sanos y enfermos de distintas partes del mundo (India, México y Africa) reveló 22 patrones (zimodemos) distintos (Sargeant y col., 1978 y 1980; Jackson y col., 1982). Diez de los 22 zimodemos se encuentran en sujetos con amibiasis invasora mientras que los otros 12 provienen de portadores. Los zimodemos asociados con mayor frecuencia con enfermedad invasora son el II y el XI; además, son los únicos encontrados asociados con

amibiasis hepática (Sargeant y col., 1982). El patrón X se ha encontrado relacionado con la enfermedad amibiana en un reducido número de enfermos mexicanos (Jiménez y col., 1982). Todos los zimodemos correspondientes a amibas patógenas comparten la banda beta de la fosfoglucomutasa y las bandas de movimiento rápido de la hexocinasa (Sargeant y col., 1982). Sin embargo, observaciones recientes (Mirelman y col., 1986; Andrews y col., 1990) demuestran la inestabilidad de los zimodemos al comunicar el cambio de zimodemo no patógeno a patógeno, de un aislado proveniente de portador asintomático, durante el proceso de axenización.

EFEECTO CITOLITICO: La actividad lítica de trofozoítos amibianos también ha sido analizado en diversos tipos de cultivos celulares (Ravdin y col., 1981; Bracha y col., 1984). La monocapa de células MDCK, una línea celular establecida de origen epitelial, consiste de una cubierta de células adherentes que forman una capa continua semejando una barrera epitelial in vivo (Cerejido y col., 1981) aportan un modelo adecuado para el estudio de la actividad citolítica in vitro de E. histolytica. El efecto es demostrado al incubar los trofozoítos a 37°C y depende de la virulencia de la cepa, cantidad de inóculo y tiempo de incubación (Drozco y col., 1975; Martínez-Palomo y col., 1985).

Otros de los sistemas empleados para diferenciar cepas de amibas incluyen:

La actividad colagenolítica la cual se encuentra fuertemente asociada a la patogenicidad y virulencia de las cepas de acuerdo a los estudios realizados por Muñoz y col. (1982).

La mayor capacidad de las cepas patógenas de fagocitar eritrocitos con respecto a las cepas no patógenas en condiciones axénicas (Trissl y col., 1977).

La alta susceptibilidad de las cepas patógenas para aglutinarse en presencia de Concanavalina A (Martínez-Palomo y col., 1973) en comparación con varias cepas axénicas no patógenas, reconocidas por su capacidad de crecer a temperatura ambiente. Esta susceptibilidad característica de las cepas patógenas está relacionada a la carencia de cargas repulsivas detectable en su superficie a pH neutro, de acuerdo a los estudios de Trissl y col., (1977).

La mayor sensibilidad a lisis en presencia de complemento de las cepas no patógenas (Calderón y col., 1986) y el reconocimiento presumiblemente de cepas patógenas por anticuerpos monoclonales específicos (Strachan y col., 1988).

Finalmente, están los modelos animales. En las primeras investigaciones se emplearon gatos y perros para establecer la patogenicidad de E. histolytica (Stilwel, 1955; Bloomfield, 1957). Otras especies animales han proporcionado modelos satisfactorios de aspectos limitados de la enfermedad, incluyendo conejos (Tobie, 1949); cobayos (Maegraeth y col., 1953); hámster (Tanimoto y col., 1973; Tsutsumi y col., 1984); ratas (Singh y col., 1971; Ross y col., 1973); ratones (Mattern y col., 1977); primates (Martínez-Reyes y col., 1980). El mas

ampliamente aceptado es el modelo de hámster lactante. Las amibas se introducen directamente en el ciego o en el hígado, generalmente por inyección después de laparotomía o a través de la pared abdominal. También se han usado otras vías como la inoculación intraportal, el depósito directo en el recto, la inyección intracerebral (Martínez-Falomo, 1986) y la inoculación subcutánea y testicular en ratas (Pérez-Tamayo, 1990). La inoculación de cepas patógenas de amibas en el hígado del hámster (Hernández y López y col., 1970) y de otros roedores, resulta en la producción de un gran número de abscesos, mientras que en las mismas circunstancias, las cepas de amibas derivadas de portadores sanos no producen tales lesiones, el efecto es específico de cepa y de la dosis o número de amibas empleado (Tanimoto-Weki y col., 1973). Este es uno de los criterios más generalmente aceptados para comparar con otros marcadores de patogenicidad (Diamond y col., 1974).

1.5. PATRONES DE RESTRICCIÓN DEL DNA EN PROTOZOARIOS

Recientemente el análisis del DNA por digestión con endonucleasas de restricción ha permitido la diferenciación de especies y cepas de diversos protozoarios. La técnica se basa en la separación electroforética de fragmentos de DNA generados por el corte con enzimas de restricción que actúan sobre sitios específicos. Los perfiles electroforéticos resultantes son marcadores bioquímicos estables, los cuales pueden ser empleados eficientemente para diferenciar poblaciones de organismos cercanamente relacionados (Panyen y col., 1985).

Con esta metodología, Morel y col. (1980) caracterizaron cepas y clones del protozoario hemoflagelado Trypanosoma cruzi, aislado de diferentes regiones del Continente Americano, comunicando en sus hallazgos que existe heterogeneidad entre las cepas estudiadas, en base a criterios morfológicos, bioquímicos, antigénicos y la propiedad de unirse a lectinas. El análisis del DNA del kinetoplasto (κ DNA) con la enzima de restricción EcoRI permitió identificar y correlacionar las cepas con el lugar correspondiente de su obtención.

Por su parte Borst y col. (1980) aplicando la misma técnica también en parásitos del género Trypanosoma de la especie brucei, agente causal de la Enfermedad del sueño en Africa, encuentran características entre las subespecies morfológicamente indistinguibles I. brucei brucei, I. brucei gambiense y I. brucei rhodesiense, con lo cual es posible diferenciarlos entre sí, así como asociarlas con el cuadro clínico que producen.

La caracterización del rDNA de parásitos del género Leishmania, responsables de enfermedad cutánea y visceral, realizada por Jackson y col. (1984) permitió reconocer que la digestión con enzimas de restricción de minicírculos del rDNA produce fragmentos característicos con los que es posible identificar a L.donovani, L.tropica, L.aethiopica, L.braziliensis y L.mexicana, parásitos morfológicamente indistinguibles. Esta metodología demostró su utilidad en estudios epidemiológicos.

Nash y col. (1985) analizaron y compararon el patrón de restricción del DNA de Giardia spp aislada de heces de 11 humanos y 4 animales (2 castores, 1 gato y 1 cobayo). Los resultados obtenidos del análisis con Southern blot, que es un método que permite la separación de fragmentos de DNA, su transferencia e hibridación con sondas específicas, fue posible distinguir 9 patrones diferentes entre los 15 aislados estudiados, se observó un patrón de bandeo común en 6 aislados (2 de animales y 4 de humanos). Tres aislados (1 de castor y 2 de humanos) presentaron diferencias marcadas al patrón común, mientras que los restantes 6 aislados variaron moderadamente. No se observaron diferencias que permitieran distinguir entre aislados provenientes de humanos y otros mamíferos, lo cual sugiere que no existe una especie propia de humanos.

Los patrones de restricción del DNA total permitieron la diferenciación de especies, subespecies y cepas de Naeqleria (N.fowleri, N.lavaliensis, N.gruberi, N.jardivi, N.australiensis) y 2 géneros relacionados (Didasculus thoratori y Wellaertia

magna) (Jonckheere y col., 1987). Los estudios confirmaron la variación detectada con técnicas serológicas y bioquímicas entre las cepas de N.australiensis, así como entre las cepas de N.gruberi.

Posteriormente Bahattacharya y col. (1988) empleando la enzima de restricción EcoRI en la digestión del DNA de Entamoeba spp (E.histolytica, E.histolytica-like, E.moshkovski y E.terrapinae) encuentran polimorfismo en los sitios de corte, sin embargo, la presencia de bandas discretas en cada muestra de DNA compartiendo un doblete común de 0.7 a 0.9 kbp, permite diferenciar a la especie histolytica de otras especies que carecen de éste.

2. JUSTIFICACION

2. JUSTIFICACION.

La amibiasis continúa siendo un problema de salud frecuente en países en desarrollo, incluyendo México. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la infección con E.histolytica está presente en cerca de 480 millones de personas en el mundo, de éstos en el 10% de los casos el parásito invade los tejidos del huésped. La relevancia de esta enfermedad es que anualmente mueren de 40,000 a 110,000 personas por complicaciones intestinales y extraintestinales de la amibiasis (Treviño, N., 1989). En el 90% de los individuos infectados con E.histolytica (portador asintomático) se desconocen las causas del comportamiento aparentemente inocuo del parásito (Sepúlveda, 1986). Investigadores y grupos de trabajo en amibiasis han sugerido criterios y diseñado diversos procedimientos con la finalidad de clasificar y definir diferencias entre aislados de E.histolytica obtenidos de portadores asintomáticos y pacientes con amibiasis invasora. No obstante, la mayor parte de estudios de caracterización de E.histolytica se han llevado a cabo con cepas mantenidas en cultivos axénicos por mas de 15 años, correlacionando los resultados con cepas de amibas axénicas de origen no humano (cepas Laredo y moschkovskii de aguas negras) o de animales (cepa invadens que parasita reptiles), esto ante la ausencia de cepas axénicas provenientes de portadores asintomáticos.

Por lo tanto, consideramos importante caracterizar aislados de E.histolytica obtenidos de portadores asintomáticos y

pacientes con amibiasis invasora, mantenidos en cultivos polixénicos que conserven la microbiota intestinal original, mediante el patrón electroforético de enzimas de la vía glucolítica (zimodemos), determinación de daño a monocapa de células MDCK y el análisis del patrón de restricción del DNA. Los dos primeros estudios (zimodemos y daño a monocapa) han sido empleados en la caracterización de cepas axénicas y xénicas de E.histolytica y la caracterización por patrones de restricción del DNA (esquizodemos) han mostrado su utilidad para diferenciar especies y cepas de diversos protozoarios.

3. HIPOTESIS

3. HIPOTESIS

Ho: Existe correlación entre los criterios clínicos y los criterios experimentales in vitro de aislados de Entamoeba histolytica de portadores y pacientes sintomáticos

Ha: No existe correlación entre los criterios clínicos y los criterios experimentales in vitro de aislados de Entamoeba histolytica de portadores y pacientes sintomáticos

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

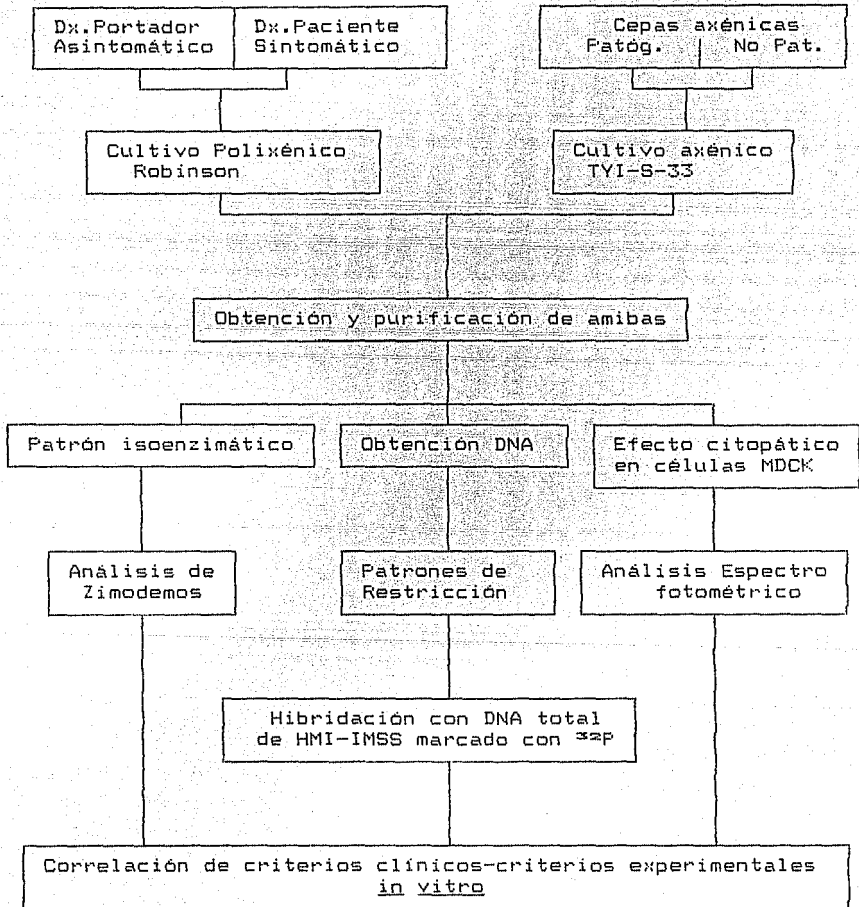
Caracterizar por criterios experimentales in vitro, aislados de Entamoeba histolytica mantenidos en cultivos polixénicos, obtenidos de portadores asintomáticos y pacientes sintomáticos y correlacionar los criterios clínicos con los criterios experimentales in vitro

OBJETIVOS PARTICULARES

Estandarizar métodos para cultivo masivo en condiciones polixénicas y procedimientos de separación amiba/microbiota

Verificar la utilidad de los patrones de restricción del DNA de Entamoeba histolytica como marcadores de patogenicidad

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se seleccionaron de acuerdo al criterio clínico, (Figura 3) cepas provenientes de portadores asintomáticos con serología negativa y examen rectosigmoidoscópico negativo y cepas provenientes de pacientes sintomáticos con serología positiva. Los trofozoítos en presencia de la flora intestinal original se sembraron en el medio polixénico de Robinson modificado. Para ser empleadas como control, la microbiota intestinal original asociada al cultivo polixénico se separó y cultivó en medio de Luria (específico para bacterias) y las cepas de Entamoeba spp mantenidas en cultivo axénico.

Cuando las amibas alcanzaron su crecimiento logarítmico se separaron de la microbiota asociada al cultivo polixénico. Se estudió el corrimiento electroforético de las enzimas GPI, PGM, ME y HK para definir el patrón isoenzimático de patogenicidad (zimodemos) así como la fagocitosis de células epiteliales MDCK crecidas en monocapa por los trofozoítos obtenidos de los diferentes aislados. En ambos ensayos se utilizaron como controles cepas cultivadas axénicamente y la microbiota asociada al cultivo polixénico. Se obtuvo y purificó el DNA de los aislados de E.histolytica cultivados polixénicamente.

El DNA se cortó con la enzima de restricción EcoR1. Los fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y se transfirieron a filtros de nylon, se hibridaron mediante el método de Southern blot con DNA total de la cepa HM:1-IMSS marcada con ³²P. Finalmente se

correlacionaron los criterios clinicos con los criterios
experimentales in vitro.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Material biológico

a. Cepas axénicas de Entamoeba histolytica.

HM:1-IMSS.- Aislada en 1967 de un paciente con disentería amibiana y úlcera rectal (México, D.F.) (Diamond y col., 1972)

HM:38-IMSS.- Aislada en 1967 por punción hepática de un paciente con absceso hepático amibiano (México, D.F.) (De la Torre, 1974)

HK:9-NIH.- Aislada en 1951 de un paciente con disentería amibiana aguda (Korea) (Tobie, 1949)

Cepa Laredo.- Aislada en 1956 de un paciente con poliposis adenomatosa de colon y disentería (Goldman y col., 1962)

b. Cepas polixénicas de E.histolytica.

HM-2.- Aislada en 1988 de un portador asintomático con serología negativa (San Francisco California, U.S.A.) (Reed, 1988)

HM-43.- Aislada en 1987 de un portador asintomático con RSC y serología negativas (México, D.F.) (De la Torre, 1987)

HM-44.- Aislada en 1988 de un portador asintomático con RSC y serología negativas (México, D.F.) (De la Torre, 1987)

HM-4.- Aislada en 1988 de un paciente sintomático con serología negativa (San Francisco California, U.S.A.) (Reed, 1988)

HM-46.- Aislada en 1986 de un portador asintomático con RSC y serología negativa (México, D.F.) (De la Torre, 1986)

HM-50.- Aislada en 1989 de un paciente con disentería amibiana aguda y serología positiva (México, D.F.)

6.2. Cultivo

a. Cultivo axénico de trofozoitos de E.histolytica

Los trofozoitos de E.histolytica, cepas HM-1:IMSS, HM-38:IMSS, HK-9:NIH se cultivaron a 37°C y la cepa Laredo, se cultivó a temperatura ambiente en el medio axénico TYI-S-33 (Diamond y col, 1978) suplementado con 15% de suero bovino (Sigma No.) y 3% de mezcla de vitaminas de Diamond (Sigma No.). Para subcultivar, se agitaron suavemente los botellas de cultivos confluentes y se tomó una alícuota de trofozoitos, inoculándose en botellas de 250 ml con medio fresco (Anexo 1).

En el caso de cultivos masivos, los trofozoitos se propagaron en cajas de cultivo de 500 ml y se cosecharon cuando alcanzaron su fase logarítmica de crecimiento (72 h).

b. Cultivo polixénico de trofozoitos de E.histolytica

Los trofozoitos de las cepas HM-2, HM-4, HM-43, HM-44, HM-46 y HM-50 se sembraron a 37°C, en presencia de la microbiota intestinal original, en medio de cultivo de Robinson (1968) y en el medio bifásico de Boeck y Dbrohlav (1925).

1. Medio de Robinson (1968). Este es un medio de cultivo que se compone de los siguientes elementos: Bactopeptona al 20%, Bifalato, Medio definido "R" para crecimiento de la bacteria Escherichia coli silvestre, medio amibiano basal "BR" y suero bovino o plasma humano, medio completo "BRS" (Anexo No. 2).

Cultivo primario. Aproximadamente 50 mg de heces frescas no tratadas, se adicionan a botellas de 7 ml de capacidad, con 4 gotas 0.12 ml de eritromicina al 0.5% y 4 ml de medio "BRS" completo y se incuban por 24 h a 37°C. En las muestras positivas se elimina el sobrenadante líquido y se adicionan 2 gotas de eritromicina (0.06 ml) al 0.5%, 2 gotas de peptona al 20%, 4 ml de medio "BRS" completo y 50 mg de almidón de arroz. Se incuban 24 h a 37°C.

Sulcutivos. Este paso se hace cuantas veces sea necesario hasta observar que las amibas se encuentran adaptadas y en crecimiento.

Modificaciones. Las amibas una vez adaptadas a este medio se transfirieron a botellas de plástico de 50 ml de capacidad sin base de agar, con 40 ml de medio "BRS" completo. En nuestro caso, empleamos plasma de humano en lugar de suero de carnero. Se incubaron a 37°C hasta llegar a confluencia, se verificó el crecimiento en el microscopio invertido y se cambió el medio cada 24 h. Para la propagación del cultivo, cada una de las cajas de plástico con crecimiento amibiano confluyente se resebró agitando vigorosamente para despegar las amibas y se transfirió alicuotando en partes proporcionales a cajas de cultivo de 260 ml con medio fresco hasta obtener crecimiento confluyente. Cuando se observó crecimiento excesivo de la microbiota bacteriana, se adicionó 0.5 µg/ml de ampicilina y 0.1 µg/ml de kanamicina.

2. Medio de Boeck y Dbrohlay (1925). Este medio está compuesto de dos fases: una fase sólida consistente en una suspensión

coagulada de huevo de gallina, sangre y solución de Ringer, y una fase líquida, la cual está compuesta de solución de Ringer y solución salina amortiguada, pH 7.0 (Anexo No. 3).

Se sembraron trofozoítos de E.histolytica con su microbiota asociada verificándose el crecimiento por medio de preparaciones en fresco observadas al microscopio de luz, efectuándose cambio de la fase líquida del cultivo por medio fresco cada 48 h.

c. Cultivo de bacterias asociadas al cultivo polixénico en medio de Luria

La microbiota intestinal asociada a las cepas polixénicas se recuperó y se cultivó en medio de Luria (1952) (Anexo No.).

d. Cultivo de células MDCK.

Las células MDCK son de origen epitelial y fueron cultivadas en cajas de cultivo Costar^{MR} (24 pozos) con el medio esencial de Eagle, suplementado con suero de carnero al 10% (), 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomycin en atmósfera con CO₂ al 5% a 36.5°C (Anexo No.).

6.3. Separación de trofozoítos de E. histolytica de la microbiota asociada en cultivo polixénico.

a) Por adherencia al vidrio. Se despegaron por agitación suave los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento de cultivos masivos de 500 ml en botellas, se lavaron y resuspendieron en solución de Ringer. Se filtraron sobre la fibra de vidrio (MARCA) a 37°C, se incubaron los filtrados con la fibra de vidrio a 37°C por 30 min. Las amibas se despegaron de la fibra de vidrio con solución de Ringer a 4°C por 10 min, posteriormente se centrifugaron los sobrenadantes a 2,000 x g por 10 min. Se determinó la densidad ambiental con un hemocitómetro.

b) Separación por gradiente de Percoll. Se ajustó la osmolaridad del Percoll (Sigma No.) a 230 mOsm/kg de agua con PBS 10X y se formó un gradiente discontinuo de 10, 20, 40, 60, 80 y 100%, en tubos Falcon de 50 ml con tapón de rosca. Posteriormente se agregaron 1×10^6 trofozoítos cultivados en el medio polixénico de Robinson con su microbiota asociada por tubo y se centrifugó a 2,000 x g por 15 min. Con el empleo de una pipeta Pasteur, se separó cada fase en tubos de centrifuga de 15 ml y se realizaron preparaciones en fresco para observar al microscopio de luz y localizar la fracción que contenía los trofozoítos. Cada fracción se lavó con solución de Ringer y se tomó una alícuota para contar con hemocitómetro.

6.4. Determinación de patrones isoenzimáticos.

a) Obtención de extractos amibianos.

Las amibas se crecieron (cultivos axénicos y polixénicos) hasta llegar a la fase logarítmica en el medio de cultivo correspondiente. Los cultivos axénicos se agitaron vigorosamente para despegar las amibas y se lavaron 3 veces con PBS. La centrifugación se llevó a cabo en una centrifuga Beckman refrigerada, por 4 min a 1,000 rpm. En los cultivos polixénicos, primero se decantó el medio de cultivo y posteriormente las amibas pegadas a las paredes fueron despegadas por agitación con PBS frío (4°C).

La pastilla de las amibas lavadas se colocó en el un volumen del amortiguador de lisis que contenía: 10 mM de ditiotreitól, 10 mM de EDTA pH 8.0 y 10 mM de ácido 6-aminocaproico. Con una pipeta Pasteur se colectó está suspensión y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Los tubos eppendorf con la suspensión de amibas se colocaron en nitrógeno líquido hasta que se congelaron completamente. La suspensión congelada se descongeló colocándola en un baño de agua a 37°C. Este ciclo de congelación-descongelación se repitió 3 veces. Los extractos se centrifugaron a 30,000 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante de los extractos se alicuotó en volúmenes de 100 µl en tubos eppendorf de 1.5 ml y se almacenaron a -70°C. Previo al empleo de las fracciones sobrenadantes, se aumentó la densidad, agregándoles a cada tubo 40 µl de una solución estéril de sacarosa al 70% (w/v).

b) Electroforesis de los extractos amibianos para isoenzimas.

La electroforesis se llevó a cabo en un sistema vertical (MARCA) con placas de vidrio de 140 x 160 x 1.5 mm. Se prepararon geles no desnaturalizantes nativos, en gradientes de concentración del 3 al 7% de acrilamida con 0.90% de bisacrilamida en el amortiguador A (Tris-NaOH 0.015 M, ácido maléico 0.015 M, $MgCl_2$ 0.0032 M, EDTA 0.0015 M, pH 7.4). Antes de agregar el gel separador a las placas de vidrio, fué necesario sellarlas con papel parafilm o masking-tape. Se agregaron 2 ml de acrilamida al 20%, lo cual sirvió como soporte para sostener al gel separador antes de que éste polimerizara. Hubo que esperar 15 min con el fin de permitir que polimerizara el soporte. El gradiente del gel separador se realizó en una cámara para formar gradiente, y la solución se dosificó con la ayuda de una bomba peristáltica. Para vaciar el gel separador dentro de la cámara de vidrio fué necesario colocar la manguera de salida de la bomba peristáltica, en una de las esquinas de las placas de vidrio, moverla horizontalmente y de manera constante a lo largo de las placas a fin de repartir homogéneamente la solución de acrilamida del gradiente y permitir así que se formara correctamente el gradiente dentro de las placas. Cuando terminó de pasar toda la solución del gel separador se dejaron aproximadamente 0.5 cm de espacio vacío, el cual fue suficiente para colocar inmediatamente el peine para formar los pozos que sirvieron para depositar las muestras que fueron analizadas. Los geles permanecieron sin moverse hasta que polimerizó totalmente la acrilamida (aproximadamente 2 h). Se retiró el peine y se lavaron los pozos

con agua destilada o amortiguador de corrida (Amortiguador de corrida 10 X: Trizma base 1 M, ácido maléico 1M, $MgCl_2$ 0.21 M, EDTA, 0.1 M, pH 7.4). Se llenaron los pozos con el amortiguador de corrida y se aplicaron las muestras (20 a 40 μ l) con una jeringa Hamilton de 50 μ l. Se sellaron las placas electroforéticas y se colocó en la cámara el amortiguador de corrida. La temperatura del amortiguador se mantuvo por abajo de 10°C. Los geles se corrieron a 60 volts por 12 h. Al término de la electroforesis, el gel se separó de las placas de vidrio y se colocó en un recipiente que contenía la solución de reacción específica para cada enzima (Anexo No.4). Se preparó un gel para cada enzima. El recipiente se cubrió con papel aluminio y se incubó durante 30-45 min a 37°C para el desarrollo de la reacción evidenciada por el cambio de color. Se retiró la solución de reacción y el gel se enjuagó varias veces con agua destilada. Se fijó el color de los geles con ácido acético al 7% (v/v). Se tomó una impresión fotográfica inmediatamente con una cámara Polaroid 667.

c) Reducción de almidón del medio de cultivo monofásico de

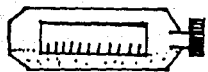
Robinson. Observaciones previas realizadas evidenciaron que sólo una proporción del almidón agregado al medio de cultivo era consumido por los trofozoitos, por lo que se redujo progresivamente la cantidad de almidón de 150 mg/100 ml, a 100 y 60 mg/100 ml. Antes de cosechar los trofozoitos (a las 48 h de cultivo) se recambió el medio de cultivo "BRS" con medio fresco y 30 mg/100 ml de almidón. Los trofozoitos se cosecharon por agitación suave y se lavaron con PBS 1X a 500 x g por 4 min por 3 ocasiones y se tomó una alícuota para contar con hemocitómetro.

6.5. Actividad lítica de trofozoítos de E. histolytica en monocapa de células epiteliales MDCK.

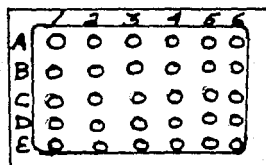
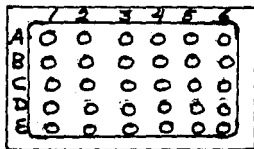
Los trofozoítos se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento y centrifugaron a $500 \times g$ por 4 min, el paquete se resuspendió en medio MEM sin suero y se contó con hemocitómetro.

La línea celular establecida MDCK se creció con medio MEM en monocapa de células confluentes en placas de cultivo Costar^{MR} de 24 pozos de 17 mm de diámetro a 36.5°C en una cámara de CO_2 al 5%. Se lavaron los cultivos 2 veces con 100 ml del medio MEM. Para determinar la lisis, se colocaron 1, 2 o 3×10^5 trofozoítos por cada pozo de cada una de las cepas polixénicas y axénicas, así como de los controles (medio MEM sólo, bacterias asociadas al cultivo polixénico y crecidas en medio de Luria). Posteriormente la mezcla se incubó por 1 h a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%. Finalmente se lavaron las placas con PBS, se tiñeron con azul de Comassie R-250 al 0.125% en abe y se fijaron con glutaraldehído al 2.5% (v/v) en un amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.2. Considerando la ausencia total de la monocapa de células teñidas como el 100% de efecto citopático y la presencia indemne de la monocapa de células MDCK como el 0% de efecto citopático, se determinó la actividad citolítica por espectrofotometría (MARCA) (Figura 4).

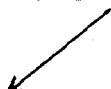
Cultivo de *E. histolytica*
en medio polixénico.



Separación de trofozoitos
por centrifugación diferencial.



Cultivo de células MDCK
37°C (CO₂ 5%)



Trofozoitos sobre
monocapa confluyente
de células MDCK.



Incubación a 37°C/1h, CO₂ 5%



Fijación y tinción



Determinación del daño
por espectrofotometría

FIGURA No. 4. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA
ACTIVIDAD LITICA DE TROFOZOITOS SOBRE MONOCAPA
CONFLUENTE DE CELULAS MDCK

6.6. Extracción y purificación de DNA amibiano.

a) De cultivos axénicos.

Se cosecharon de $1-10 \times 10^4$ amibas en fase logarítmica de crecimiento (48 h) de frascos de cultivo de 260 ml. La pastilla se lavó 3 veces con el medio de cultivo TYI-S-33, se resuspendió cuidadosamente con un volumen igual de amortiguador de lisis a 4°C (Trizma 10 mM pH 8, KCl 24 mM, MgCl₂ 10 mM, espermidina 0.6 mM, N-etilmaleimida 5 mM, p-hidroximercuribenzoato 0.05 mM) y se revisó la integridad de las amibas al microscopio. Se agregó 1 volumen de Nonidet P-40 al 10% a una concentración final del 1% y se agitó vigorosamente dentro del baño de hielo. Se corroboró al microscopio la ruptura de todas las amibas y la integridad de los núcleos. La suspensión se pasó por un colchón de 10 ml de sacarosa 1M (en Trizma 10 mM, KCl 24 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 8) en tubos Corex de 30 ml para separar los núcleos. Se centrifugó a 6,000 rpm por 12 min (rotor Sorvall HB-4). Se quitó con cuidado el sobrenadante y se resuspendió la pastilla muy suavemente en 500 μ l de EDTA 0.5 M pH 8 y Sarkosyl 1%. El DNA se extrajo con un volumen igual de fenol equilibrado con inversiones suaves por un min. Se centrifugó durante 3 min para separar las fases y se quitó la fase orgánica (que en este caso es la fase superior, ya que a tan alta concentración de sal usada las fases se invierten). Se extrajo nuevamente con un volumen igual de fenol equilibrado como se indicó anteriormente. Se extrajo el DNA 2 veces mas con un volumen igual de cloroformo alcohol isoamílico recuperando en ambos casos la fase acuosa (fase superior). El DNA

se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol frío e inversiones suaves hasta que se formó una red, la cual se recuperó con una punta de micropipeta y se resuspendió con cuidado en 500 μ l de agua destilada estéril. El DNA se precipitó con 1/10 del volumen de una solución saturada de acetato de amonio y 2.5 volúmenes de etanol frío obteniéndose nuevamente una red. El DNA se resuspendió sin secar previamente en 500 μ l de agua destilada estéril. Alícuotas de 1, 5 y 10 μ l del DNA se corrieron junto con DNA estándar de concentración conocida (DNA del fago lambda cortado con HindIII empleado como marcador de peso molecular) en un minigel de agarosa al 1% en TAE y se tiñeron con bromuro de etidio, se tomó una impresión fotográfica con cámara Polaroid 667 usando un transiluminador de luz ultravioleta, se verificó visualmente la integridad del DNA al cuantificar la intensidad de fluorescencia de los DNAs estándar y DNA muestra.

b. De cultivos polixénicos.

Se crecieron las amibas hasta confluencia en botellas de plástico de 200 ml, se decantó el medio de cultivo y las amibas pegadas al sustrato, se despegaron con PBS y agitación vigorosa. Las amibas se lavaron 3 veces con PBS y posteriormente se siguió el mismo protocolo utilizado en los cultivos axénicos.

6.7. Extracción del DNA de la microbiota asociada al cultivo polixénico.

La microbiota asociada se separó de los cultivos polixénicos por centrifugación diferencial a 15,000 rpm por 30 min y se cultivó en el medio de Luria en agitación constante. Cuando alcanzó el crecimiento logarítmico (48 h), se obtuvo el sobrenadante y se centrifugó a 2,500 x g por 10 min. El paquete se resuspendió en 500 µl de PBS 1X y se incubó con 100 µl de lisozima (50 mg/100 ml) a 4°C por 30 min. Posteriormente se agregó Sarkosyl al 20% y el DNA se extrajo. Se verificó su integridad como en el procedimiento anterior.

6.8. Digestión del DNA ambiental con la enzima de restricción EcoRI y análisis en geles de agarosa al 1%.

El DNA de las cepas axénicas y de los aislados polixénicos se digirió con la enzima de restricción EcoRI (de acuerdo al Manual Biolabs (19)). Para ello se colocaron en tubos eppendorf nuevos y estériles 10 µg de DNA disuelto en 10 µl de ABE de cada una de las cepas axénicas y polixénicas. Se agregaron 10 unidades (u) de enzima y 10 µl del amortiguador 10X correspondiente a la enzima de reacción EcoRI (Manual Biolabs, 19) y se aforó a 50 µl con ABE (todo el proceso se realizó a 4°C). Se mezclaron los componentes suavemente y se incubaron a 37°C por 12 h.

Posteriormente se corrió el DNA digerido en un gel de agarosa al 1% en una cámara mediana a temperatura ambiente por 30 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio durante 10 min a temperatura ambiente y se fotografió usando un transiluminador de luz ultravioleta y cámara Polaroid 677.

Los patrones de restricción resultantes de las cepas polixénicas, se compararon con el patrón de la cepa HM:1 cortado con la misma enzima.

6.9. Transferencia del DNA amibiano digerido e hibridación con DNA total de HM:1-IMSS marcado con ^{32}P .

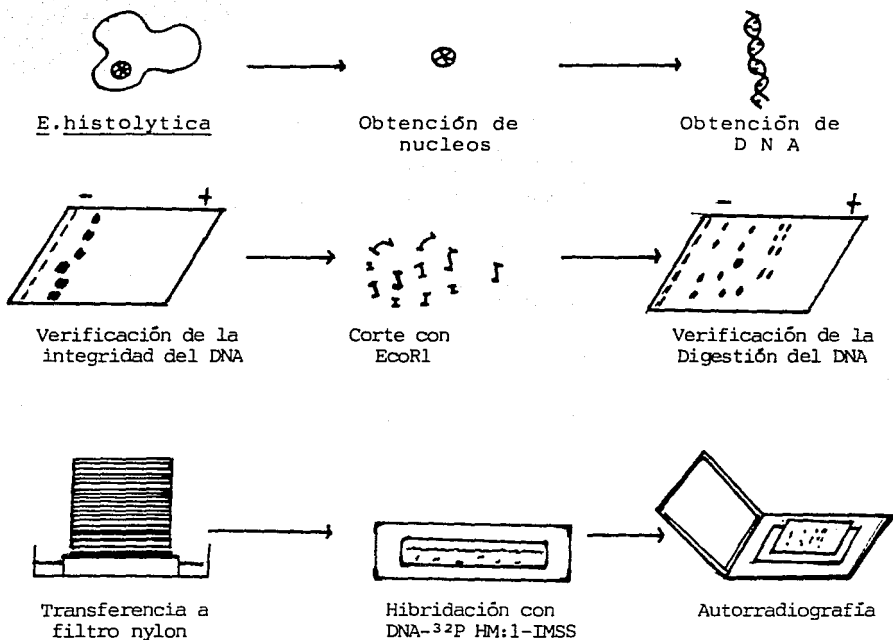
El DNA digerido tanto de las cepas axénicas como polixénicas, contenido en el gel de agarosa al 1% se colocó por un minuto en luz ultravioleta para depurarlo. Se depuró con HCl 0.25 M por 15 min en agitación constante a temperatura ambiente; se desnaturalizó con una solución de NaOH 0.5 M y NaCl 1M por 15 min y se neutralizó con una solución que contenía Trizma-HCl 1M pH 8 y NaCl 0.6 M durante 15 min. A continuación se transfirió a un filtro de Nylon (Nytran, MARCA): en un recipiente de vidrio y una base con dimensiones de 11 x 14 cm se colocó papel filtro Wathman 3MM de 11 x 18 cm seguido del gel invertido y sobre éste, un filtro de nylon (Nytran), retirando previamente todas las burbujas, sobre éste 2 papeles filtros Wathman 3MM. Posteriormente se colocó una capa de 10 cm de altura de toallas absorbentes secas y una placa de vidrio sobre las cuales se colocó un frasco de vidrio con peso de 1 kg, todo esto sumergido en una solución de citrato salino (SSC) 10X, suficiente para humedecer los extremos del papel filtro pero sin tocar el papel de toallas absorbentes. Se transfirió por difusión a temperatura ambiente durante toda la noche y después de esto, el filtro Nytran se horneó a 70°C por 2 h a 20 lb en un horno con vacío. Para el proceso de prehibridación el filtro Nytran se colocó en una bolsa para hibridación sellada con calor agregándose previamente la solución de prehibridación (SSC 20 X, formamida 100%, Solución Denhardt 100 X (Anexo No.8),

amortiguador de fosfato de sodio 0.5 M pH 6.5, DNA de esperma de salmón) en un volumen de 100 μ l/cm². Se incubó en un baño de agua a 42°C en agitación constante durante toda la noche. Posteriormente se retiró la solución de prehibridación y se colocó la solución de hibridación (SSC 20 X, Formamida 100%, Solución Denhardt 100 X, Amortiguador de Fosfato de Sodio 0.5 M pH 6.5 y Dextrán Sodio Sulfato 50%) en la misma proporción volumen/superficie del papel.

Previamente se marcó el DNA total de HM:1-IMSS con ³²P de acuerdo al protocolo de Amersham Multiprime DNA Labelling Systems RFN-1600. Brevemente, el DNA se diluyó en un volumen final de 10 μ l en agua destilada estéril y se desnaturalizó a 96°C por 10 min en un baño de agua hirviendo, colocándolo inmediatamente después en hielo. Se agregaron 4 μ l de cada nucleótido frío (dATP, dGTP, dTTP), 5 μ l de amortiguador (Solución 1), 5 μ l de primer (Solución 2), agua destilada estéril a un volumen final de reacción de 50 μ l, 5 μ l de (α -³²P)dCTP (10 mCi/ml) y 2 μ l de la enzima de reacción (Solución 3). Se mezcló suavemente por pipeteo y se centrifugó a 15,000 rpm por 5 segundos en una microcentrífuga para coleccionar en el fondo la mezcla de reacción. Se incubó a 37°C por 30 min. El DNA marcado se separó de los nucleótidos libres utilizando el método de minicolumna de Sephadex G-50 (Sigma), como sigue: la mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 100 μ l con STE (STE: NaCl 0.1 M, Trizma 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) para detener la reacción. La resina se equilibró colocando 2 g de Sephadex G-50 por cada 50 ml de STE, se esterilizó por autoclave a 121°C a 15 lb de presión

por 15 min y se guardó a 4°C hasta su uso. Una jeringa de 1 ml a la que se le colocó un tapón de fibra de vidrio siliconizada y estéril se llenó hasta 0.8-1 ml con la resina y se lavó 2 veces con 100 µl de STE por centrifugación a 3,000 rpm por 4 min. La mezcla de reacción se pasó por la minicolumna recuperando el DNA-³²P exento de nucleótidos libres por centrifugación de la minicolumna a 3,000 rpm por 4 min. La sonda ya marcada se desnaturalizó a 96°C por 10 min y se agregó con una micropipeta a la bolsa de hibridación que contenía el filtro Nytran. Posteriormente, se incubó en un baño de agua a 42°C durante toda la noche para permitir la hibridación. Pasado este tiempo, se retiró la solución de hibridación con la sonda marcada, y el filtro Nytran se lavó bajo condiciones relajadas (para sondas heterólogas) con soluciones de alta astringencia (soluciones hiperosmolares) empleando para ello SSC 6X con SDS al 1% en 2 ciclos de 15 min cada uno a 37°C, 42°C y un ciclo de 30 min a 60°C hasta eliminar el fondo radiactivo detectándolo con el contador Geiger. Los filtros Nytran conteniendo el DNA se colocaron en cassette X-Omatic Kodak con película Kodak X-Omatic para rayos X a 70°C por el tiempo necesario hasta evidenciar la hibridación por autorradiografía (Fig. 5).

FIGURA no. 5 . TRANSFERENCIA DEL DNA DIGERIDO CON EcoRI A
FILTRO NYTRAN E HIBRIDACION CON DNA- ^{32}P HM:1-IMSS



Lic

7. RESULTADOS

7.1. Cultivo polixénico de aislados de E. histolytica

Los trofozoitos y microbiota asociada de los aislados de portadores y sintomáticos fueron cultivados inicialmente en el medio de Boeck y Dbrohlav, modificado por De la Torre (1970). Este medio está constituido por 2 fases: una fase sólida consistente en una suspensión coagulada de huevo de gallina y sangre de carnero (o humano) y una fase líquida constituida de sales en solución acuosa.

Con la finalidad de obtener el número requerido de trofozoitos para la obtención de ácidos nucleicos, se sembró en tubos con tapón de rosca de 25 ml, con un rendimiento de 200,000 amibas; en matraz de Erlenmeyer de 125 ml con un rendimiento de 1×10^6 amibas; en matraz de 250 ml produciéndose 2×10^6 amibas; en matraz de 500 ml, con un rendimiento de 4.5×10^6 amibas y finalmente en matraz de 1,000 ml con un rendimiento de 7.5×10^6 amibas, incrementando el número de matraces de acuerdo al número total de amibas necesario.

El rendimiento final después del procedimiento de separación amibas/microbiota disminuyó drásticamente hasta en un 30-40% al tratar de eliminar los restos de fase sólida y almidón de arroz, además de las bacterias.

Por lo anterior, y con la finalidad de obtener un rendimiento mayor final, los aislados fueron adaptados a crecimiento en el medio de cultivo de Robinson adaptado por Reed (1989) en botellas de cultivo de plástico (Costar^{RM}) sin base de agar, lo cual permitió observar microscópicamente en forma

directa para verificar el crecimiento amibiano y agregar los requerimientos necesarios sin la separación previa de muestras. Para ello, se resembró en botellas de plástico de 125 ml con un rendimiento de 1×10^4 amibas, en botella de 260 ml, 3×10^4 amibas y en botellas de 1,000 ml con un rendimiento de 8×10^4 amibas incrementándose el número de botellas de acuerdo a los requerimientos de trofozoitos para la obtención de extractos amibianos, ácidos nucleicos y utilizarlos para la prueba de actividad citolítica. Es importante resaltar que se empleó plasma humano envejecido, en lugar de suero de bovino, lo cual disminuyó notablemente el costo del medio sin modificar la calidad y cantidad del cultivo.

7.2. Separación amibas/microbiota asociada al cultivo polixénico.

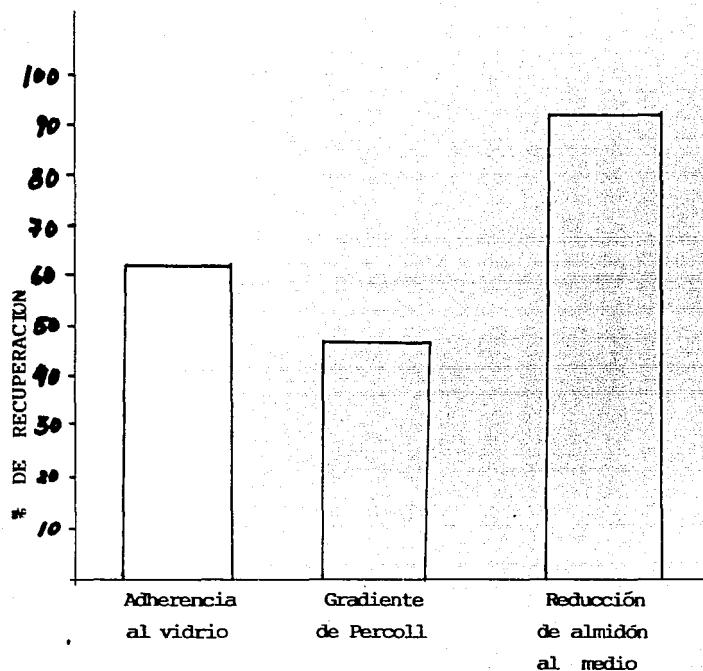
Una vez alcanzado el número de amibas requerido para la obtención de ácidos nucleicos, el siguiente objetivo fué la separación de la microbiota asociada, la cual, durante el proceso de cultivo masivo, se incrementó importantemente.

De los procedimientos empleados para la separación amibas/microbiota asociada, previamente descritos, el método de adherencia a fibra de vidrio, obtuvo un rendimiento $\geq 65\%$ de trofozoitos recuperados con respecto al número total de trofozoitos inicialmente cosechados y cuantificados con hemocitómetro. No obstante, aún cuando el proceso de adherencia parecía selectivamente amibiano, un buen número de bacterias permanecía adherido a la superficie de los trofozoitos. En relación a la separación amibiana por la formación de un gradiente discontinuo de esferas de sílice cubiertas de polivinilpirrolidona (Percoll), se observó en las bandas superiores del gradiente (10 y 20%) bacterias y granos pequeños de almidón; en las bandas intermedias (40, 60 y 80%) principalmente trofozoitos aunque también se observó un buen número de granos de almidón y bacterias; en las bandas inferiores (90 y 100%) se observaron trofozoitos ocupados con granos de almidón, granos de almidón grandes y grumos de trofozoitos, almidón y bacterias. El rendimiento final fué de $\geq 45\%$.

El medio de cultivo monofásico, sin base de agar permitió, no sólo observar el crecimiento amibiano in situ, sino también determinar la cantidad de granos de almidón agregados al medio,

la cual fue reducida gradualmente, monitoreando el aspecto morfológico de los trofozoítos. En ausencia de los granos de almidón, la separación de la microbiota se logró con centrifugaciones a bajas velocidades, permaneciendo ésta (la microbiota) por su menor densidad, en el sobrenadante y permitiendo la sedimentación, por su mayor densidad, de las amibas. Con este sencillo método, a posteriori, se logró una recuperación de trofozoítos de $\geq 90\%$ en estado viable (Figura No. 6).

FIG. No. 6. RENDIMIENTO DE ENTAMOeba BISTOLYTICA EN CULTIVO POLIXENICO POR DIVERSOS PROCEDIMIENTOS DE SEPARACION



7.3. Análisis del patrón isoenzimático (Zimodemo).

Los aislados de *E. histolytica* obtenidos de portadores y sintomáticos de acuerdo a los criterios de Sepúlveda B y Martínez-Palomo (1984), cultivados en medio polixénico se cosecharon, purificaron y se realizaron los extractos de acuerdo al procedimiento descrito en la metodología. Para analizar el patrón isoenzimático, se corrieron geles de poliacrilamida no desnaturalizantes en gradiente del 3 al 7% y se cargaron de 10-40 μ l de lisado, el cual contiene proteínas de aproximadamente 10,000 a 20,000 trofozoitos. Se emplearon como controles cepas cultivadas axénicamente: HM:1-IMSS, HM:38-IMSS, HK:9-NIH, cepa Laredo y la microbiota asociada al cultivo polixénico.

Los resultados del análisis enzimático de los aislados cultivados polixénicamente y los controles se muestran en la Tabla No. 1.

El lisado de los parásitos de los aislados HM:2, HM:43 y HM:44, provenientes de portadores asintomáticos, mostraron un patrón de zimodemo no patógeno (ZNP) correspondiente a la presencia de una banda α en la enzima fosfoglucomutasa (PGM) así como una banda de corrimiento lento o banda retrasada en la enzima hexoquinasa (HK). El zimodemo de estos aislados (HM:2, HM:43 y HM:44) pertenecen al tipo I reportado por Sargeant y col (1980). Por otra parte los aislados HM:4 y HM:50 obtenidos de pacientes sintomáticos y el aislado HM:46 obtenido de portador asintomático mostraron un patrón de zimodemo patógeno (ZP), similar al de las cepas axénicas HM:1-IMSS, HM:38-IMSS y HK:9-NIH

reconocidas como patógenas y utilizadas como controles. Los zimodemos de los aislados HM:4 y HM:46 corresponden al tipo II de Sargeant y col (1980), y sorprendentemente el aislado HM:50, obtenido de un trabajador de nuestro laboratorio con amibiasis intestinal aguda, mostró un zimodemo, raro en México, el tipo XIV reportado por Sargeant como frecuente en la India (Sargeant, 1988).

El corrimiento electroforético de la enzima málica (ME) mostró una sola banda en la misma posición en todos los aislados estudiados, lo cual caracteriza a las amibas que pertenecen a la especie histolytica.

CEFA	ZIMODENO	TIPO	CARACTERISTICAS
HM: 2	NO PATOGENO	I	* SIN BANDA ADELANTADA (HK)
HM: 43	NO PATOGENO	I	* PRESENCIA DE BANDA α (PGM)
HM: 44	NO PATOGENO	I	* ME CARACTERISTICA * MIGRACION VARIABLE (GPI)
HM: 4	PATOGENO	II	* AUSENCIA DE BANDA α (PGM)
HM: 46	PATOGENO	II	* PRESENCIA DE BANDA β (PGM)
HM: 50	PATOGENO	XIV	* BANDA ADELANTADA (HK) * ME CARACTERISTICA * MIGRACION VARIABLE (GPI)

TABLA No. 1. TIPO DE ZIMODENO DE LOS AISLADOS DE E. histolytica EN CULTIVOS POLIXENICOS.

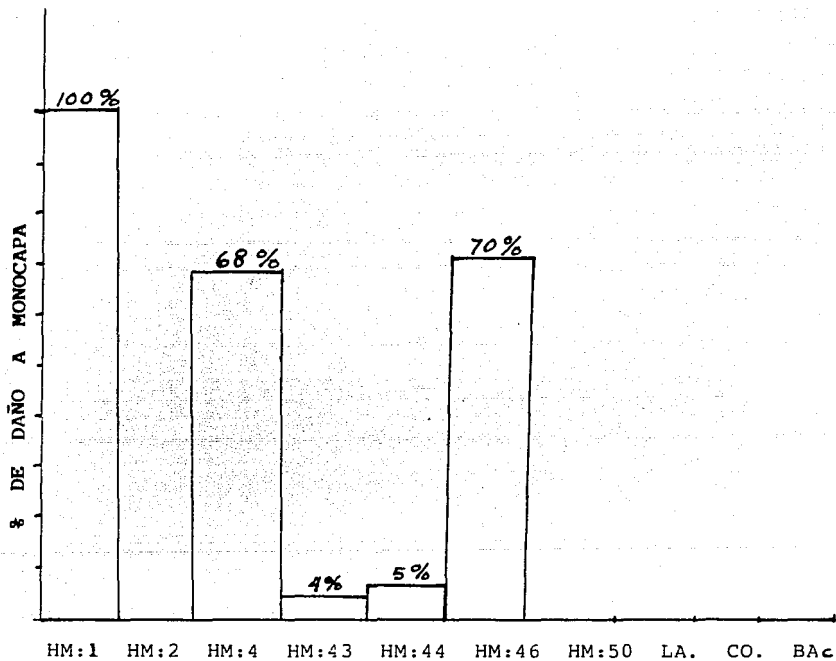
7.4. Actividad lítica de los aislados de E.histolytica en monocapa de células MDCK.

Para evaluar la actividad citopática de nuestros aislados y tratando de encontrar una correlación con los otros parámetros estudiados, empleamos células MDCK crecidas en monocapa, que forman un epitelio bidimensional con características similares a una barrera epitelial in vivo y ofrece un modelo conveniente para el estudio de la actividad citolítica in vitro de E.histolytica. Cuando trofozoítos de la cepa patógena HM:1-IMSS y células epiteliales MDCK son incubadas en una relación de aproximadamente 1:1, las células son destruidas en \approx una hora (Orozco y col, 1978). Las amibas se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento y se trataron de acuerdo al procedimiento descrito en la metodología. La actividad lítica se determinó después de incubar los trofozoítos por una hora sobre una monocapa confluyente de células MDCK.

Los resultados se pueden apreciar en la figura No. 7. En la abscisa se muestra el porcentaje de daño a monocapa y en la ordenada los carriles correspondientes a las cepas HM:1-IMSS, HM:2, HM:4, HM:43, HM:44, HM:46, HM:50, cepa Laredo y en el último carril el medio de cultivo MEM empleado como control.

Los trofozoítos de la cepa HM:1-IMSS que se utilizaron como control positivo, produjeron en una hora de incubación la desaparición total de la monocapa de células confluentes MDCK (100% de lisis), de acuerdo con lo comunicado anteriormente por Orozco y col. (1975) y Martínez-Palomo y col. (1985). Como

FIGURA No. 7 . EFECTO CITOPATICO EN MONOCAPA CONFLUENTE DE CELULAS MDCK



LA. Laredo
CO. Control
BA Bacterias

controles negativos se emplearon trofozoitos de la cepa Laredo reconocidos por el mismo autor por no causar daño a monocapa de células MDCK y también se empleó el medio de cultivo MEM sólo (0% de lisis).

Respecto a los aislados de cultivo polixénico HM:2 y HM:50 en ambos casos no hubo daño a monocapa (0% de lisis); los aislados HM:43 y HM:44 manifestaron un discreto efecto citopático (4 y 5% respectivamente) a diferencia del daño producido por los aislados HM:4 y HM:46 que mostraron un daño del 68% y 72% respectivamente.

Para determinar el papel de la microbiota asociada al cultivo polixénico, respecto a su participación como productora de efecto citopático, se separó ésta de los trofozoitos y se incubó con una monocapa confluyente de células MDCK bajo las mismas condiciones observándose que no hubo ningún cambio (0% de lisis) en la monocapa de células.

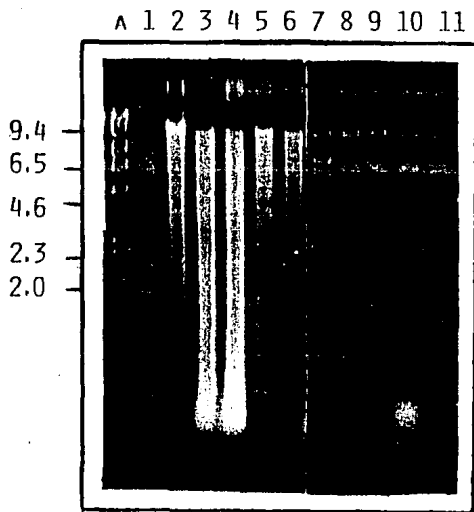
7.5. Análisis del patrón de restricción del DNA amibiano.

El análisis del DNA por digestión con endonucleasas de restricción ha permitido la diferenciación de especies y cepas de diversos protozoarios (Morel y col., 1980; Borst y col., 1981; Jackson y col., 1984; Mash y col., 1985; Jonckheere y col., 1987 y Battacharya y col., 1988). La técnica se basa en la separación electroforética de fragmentos de DNA generados por el corte con enzimas de restricción que actúan sobre sitios específicos. Los perfiles electroforéticos resultantes son marcadores bioquímicos estables, los cuales pueden ser empleados eficientemente para diferenciar poblaciones de organismos cercanamente relacionados (Panyen y col., 1985).

Para determinar el patrón de restricción, se aisló el DNA de las cepas axénicas HM:1-IMSS, HM:2-IMSS, HM:3-IMSS, HK:9-NIH y la cepa Laredo y de los aislados HM:2, HM:4, HM:43, HM:44, HM:46 y HM:50, a partir de núcleos de trofozoitos amibianos cosechados en la fase logarítmica de crecimiento. Este DNA fué digerido con la enzima de restricción EcoRI y corrido en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio (De acuerdo a la metodología mencionada previamente).

Los resultados se muestran en la figura 8. El panel A corresponde a marcadores de peso molecular (el fago lambda cortado con HindIII), en los carrilles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 se encuentra el DNA digerido de los aislados HM:2, HM:4, HM:43, HM:44, HM:46 y HM:50, respectivamente. En el carril número 7 el DNA digerido de la cepa Laredo y en los carriles 8, 9, 10 y 11,

FIG. 8 DNA DE CEPAS AXENICAS Y POLIXENICAS DE ENTAMOEBA HISTOLYTICA
CORTADO CON Eco RI



- A) MARCADORES
1) HM-2
2) HM-4
3) HM-43
4) HM-44
5) HM-46
6) HM-50
7) LAREDO
8) HM-1:IMSS
9) HM-2:IMSS
10) HM-3:IMSS
11) HK-9:NIH

el DNA digerido de las cepas HM:1, HM:2 y HM:3-IMSS y la cepa HK:9-NIH. En estos últimos carriles (7 al 11 correspondiente a las cepas axénicas) se puede observar que el patrón de restricción del DNA amibiano resultante del corte con la enzima EcoRI mostró la presencia de polimorfismo del DNA en los sitios de acción de la endonucleasa, también es posible observar en los carriles 8, 9, 10 y 11 las bandas de secuencia repetida características de E.histolytica especialmente el doblete de 0.7 y 0.9 kpb. Estas bandas solo aparecen en el DNA de E.histolytica cuando es digerido con la enzima EcoRI por lo que este doblete se encuentra ausente en la cepa Laredo correspondiente al carril número 7. Sin embargo, es evidente que no es posible discernir por este procedimiento un patrón de restricción que nos permita hallar diferencias en el DNA de los aislados cultivados en condiciones polixénicas, correspondiente a los carriles 1-6, y sólo en el carril No. 1 correspondiente a la cepa HM:2 y en carril No. 2 correspondiente a la cepa HM:4 se observa una banda discreta de aproximadamente 6.3 kpb. El barrido observado en todos los carriles correspondientes a las cepas polixénicas 1-6 es debido en buena parte a la presencia del DNA de la microbiota asociada a este tipo de cultivo.

Por lo tanto, decidimos emplear el método de corte con enzimas de restricción, transferencia e hibridación (Southern-blot) con DNA total de HM:1-IMSS marcado con ³²P con la finalidad de obtener una discriminación específica, ya que los fragmentos de DNA de los aislados transferido, hibridaría específicamente con el DNA de E.histolytica, no así el DNA

contaminante de la microbiota asociada.

Los resultados se muestran en la figura No. 9. En el panel A se muestran las cepas axénicas HM:1-IMSS; HM:2-IMSS; HM:3-IMSS y la cepa Laredo en los carriles 1-4 respectivamente. Se observa polimorfismo en los sitios de corte, sin la presencia de un patrón que permita caracterizarlas. El único aspecto relevante es la presencia del doblete de 0.7 a 0.9 kpb propia de la especie histolytica y ausente en la cepa Laredo como se puede observar en el carril No. 4.

En el panel B que incluye los carriles 5, 6 y 7 corresponde a los fragmentos del DNA digerido de los aislados polixénicos obtenidos de portadores asintomáticos HM:2, HM:43 y HM:44 respectivamente. Con el empleo de esta metodología es posible observar la presencia de bandas de alto peso molecular que corresponden a 6.5, 6.8 y 9.4 kpb así como el doblete característico de la especie histolytica.

En el carril número 8 se encuentran los fragmentos del DNA de la microbiota asociada tratado bajo las mismas condiciones y empleada como control negativo a la hibridación con DNA extraño.

Finalmente, en el panel C encontramos el DNA de los aislados polixénicos obtenidos de pacientes sintomáticos HM:4, HM:46 y HM:50 correspondiente a los carriles 9, 10 y 11. Al igual que en los carriles correspondientes a los aislados polixénicos provenientes de portadores, se observan bandas de alto peso molecular de aproximadamente 6.5, 6.8 y 9.4 kpb. Únicamente se reconoce la banda de 0.7 a 0.9 kpb que caracteriza a la especie histolytica. Por tanto, no es posible establecer un patrón de

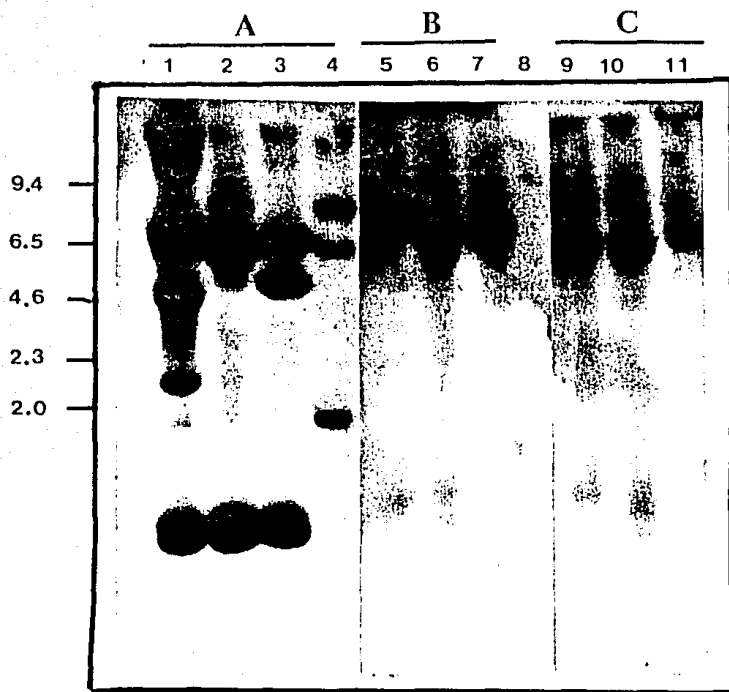


FIGURA No. 9. AUTORADIOGRAFIA DEL DNA DE CEPAS AXENICAS Y POLIXENICAS DE *E. histolytica* CORTADO CON *EcoRI* e HIBRIDADO CON DNA ^{32}P -HM:1-IMSS

Fig 9

restricción propio de este grupo que permita discernir entre aislados de portadores y sintomáticos.

8. DISCUSSION

8. DISCUSION.

La amibiasis invasora continúa siendo, por su frecuencia y gravedad, un importante problema de salud en México (Pérez-Tamayo y col., 1990). El hallazgo de quistes de E.histolytica en las heces de individuos, no siempre se correlaciona con la presencia de sintomatología propia de la enfermedad, de hecho, sólo en el 10% de los casos, el parásito invade los tejidos del huésped (Martínez-Falomo, 1986).

En la actualidad se desconocen las causas que condicionan la conducta comensal o patógena de una especie de E.histolytica en su relación con el huésped o si en realidad existen especies patógenas y especies permanentemente no patógenas, indistinguibles morfológicamente.

Los primeros estudios para diferenciar razas o cepas de E.histolytica con características diferentes se basaron en las diferencias en el tamaño de los quistes, así Ujihara en 1914 y Dobell y Jepps en 1918 observaron 5 razas de E.histolytica. Spector en 1936 distinguió 2 razas en los trofozoitos de esta amiba, la cepa grande resultó ser patógena para los gatitos y la cepa pequeña no produjo tal efecto. Meleney y Frye en 1939 sostuvieron también que existe una raza pequeña de E.histolytica, la cual tiene una capacidad débil para invadir la pared intestinal y no es patógena al hombre.

En forma similar Sapiro, Hakansson y Loutti en 1942 observaron 2 razas las cuales pueden distinguirse por los diámetros de sus quistes, siendo la línea de división de 10 y 9

μm en especímenes vivos. La raza con quistes grandes produce trofozoitos que se mueven más activamente, ingieren eritrocitos, se cultivan fácilmente y es patógena al hombre y a los gatos, en tanto que la raza con quistes pequeños produce amibas que se mueven menos activamente, no ingieren eritrocitos, son difíciles de cultivar y no son patógenas a los hospederos.

Sin embargo, es interesante observar que Cleveland y Sanders en 1930 encontraron que el diámetro de los quistes producidos por una cepa pura en cultivo la cual se había originado de un solo quiste, varió de 7 a 23 μm . Además, Meleney y Zuckerman en 1948, descubrieron posteriormente que la raza pequeña de Frye y Meleney mencionada anteriormente produjo, bajo cultivo, formas más grandes, lo cual indujo a considerar que el rango del tamaño de la raza de esta amiba es una característica que puede cambiar de pequeña a grande o viceversa, bajo condiciones ambientales diferentes.

Posteriormente y con el advenimiento del cultivo axénico de Diamond (1968) se han llevado a cabo numerosos estudios de caracterización a nivel bioquímico y molecular, aunque la mayor parte de éstos se han llevado a cabo con amibas provenientes de humanos con algún tipo de amibiasis invasora (HM:1 y HK:9) así como con amibas aisladas de reptiles (*E. invadens*) y aguas negras (*E. oshkovskii*), ello por la ausencia de cepas no patógenas en cultivos axénicos y por la dificultad que implica el mantenimiento y propagación en cultivos polixénicos.

En este estudio se emplearon aislados de *E. histolytica* crecidas con su microbiota asociada en medio de cultivo

polixénico con la intención de mantener las condiciones que reflejaran la relación huésped-parásito-microambiente.

Inicialmente, los trofozoitos se crecieron en el medio bifásico de Boeck y Drolhavl (modificado por de la Torre, M., 1972). En este cultivo se lograron las cantidades de amibas requeridas ($>10 \times 10^4$) para realizar la caracterización por patrones isoenzimáticos y citólisis dependiente de contacto, no así para los estudios de ácidos nucleicos, debido principalmente a la importante disminución en el rendimiento posterior a los procedimientos de separación amibas/microbiota.

Por lo tanto, se adaptaron los aislados al medio de cultivo monofásico de Robinson, modificado por Diamond (1982), el cual tiene varias ventajas que es importante resaltar. Las amibas se siembran en cajas de cultivo de plástico transparente, lo que hace posible verificar el crecimiento mediante el microscopio invertido (sin necesidad de realizar preparaciones en fresco) y permite decidir el momento en el cual hacer el cambio de medio fresco, el empleo de antibióticos para control del crecimiento de la microbiota o graduar la cantidad necesaria de almidón. El principal inconveniente de este medio es su alto costo, representado por las altas cantidades requeridas de suero bovino. Para salvar este obstáculo, se probó y se tuvo éxito, en el empleo de plasma humano envejecido, el cual, después del tratamiento de descomplementación (detallado en la sección de materiales y métodos), se adaptó gradualmente al cultivo y no se modificó el crecimiento de los trofozoitos. Por otro lado, resulta relativamente fácil la obtención del plasma humano envejecido, ya

que éste se deshecha de los bancos de sangre de las instituciones de salud, por perder su valor terapéutico. Con este medio de cultivo se alcanzó el número de trofozoitos requerido (10×10^4) con menor cantidad de contaminantes.

Un paso crítico en el desarrollo del trabajo lo representó la separación de la microbiota asociada, evento de relevante importancia en la obtención de ácidos nucleicos, debido a que éstos son altamente vulnerables a la degradación con endonucleasas después de la lisis de las membranas intracelulares. Para ello se probaron varios procedimientos, ya descritos en Materiales y Métodos que incluyeron:

a) La separación por gradientes discontinuos con Percoll, la cual había demostrado su eficacia en la separación de trofozoitos e incluso fracciones subcelulares de E. histolytica en cultivo axénico (Rosemberg, 1985; Avron y col., 1987). Aplicado este procedimiento a nuestros aislados en cultivos polixénicos proporcionó una recuperación realmente muy baja ($\geq 45\%$), ya que no se observó una banda preponderante de trofozoitos libres de bacterias y de granos de almidón, pues éstos se encontraron presentes en diferentes bandas, dependiendo principalmente de la cantidad de almidón ingerido por cada trofozoito.

b) La adhesión a fibra de vidrio fué otro procedimiento diseñado considerando la propiedad de las amibas de adherirse a superficies inertes como el vidrio. Con éste se obtuvo una buena separación y una recuperación aceptable ($\geq 68\%$). Sin embargo, la recuperación de trofozoitos dependió de la extensión de la superficie de la fibra de vidrio ya que este material tiene un

punto de saturación, que al ser superado, no permite la adherencia de una mayor cantidad de trofozoítos. Este es un excelente método de separación, cuando se requieren cantidades relativamente pequeñas de trofozoítos ($< 2 \times 10^5$), pero no para nuestras necesidades ($> 10 \times 10^6$) de células y macromoléculas bioquímicamente estables.

c) Disminución de almidón en el medio de cultivo. El principal problema en los procesos de separación lo constituyó la gran cantidad de granos de almidón presentes en el cultivo en el momento de cosechar los trofozoítos, ya que resultó sumamente difícil obtener amibas intactas, debido a la ruptura de las membranas amibianas por los granos de almidón durante la centrifugación y resuspensión del paquete celular. Además del daño mecánico sufrido por los trofozoítos cuando se les co-centrifugó con los granos de almidón, muchas bacterias fueron también empaquetadas, aún con velocidades muy bajas, debido a su aglutinación con granos de almidón. Todo esto disminuyó importantemente la recuperación final de trofozoítos intactos.

Pensamos que una posible solución al problema de tener granos de almidón difíciles de eliminar, sería el uso de almidón soluble. Sin embargo, al observar al microscopio, esta solubilidad no era tal pues se observaba que el diámetro de los granos era de las mismas dimensiones que el almidón no soluble. Por lo que decidimos, desechar esta alternativa y probar otro procedimiento.

Con el uso del medio de cultivo monofásico de Robinson, se facilitó el problema de la separación de la microbiota asociada,

debido a que, permitió disminuir gradualmente la cantidad de almidón agregada al medio hasta la virtual ausencia de granos de almidón, verificado por medio del microscopio invertido. En ausencia de éstos, la separación fue relativamente sencilla pues con lavados suaves se pudieron eliminar la mayor parte de las bacterias en suspensión, aún cuando algunas pudieron permanecer unidas a la superficie de los trofozoitos en vesículas recién endocitadas.

Solucionados los problemas referentes a la obtención y separación de trofozoitos de cultivos polixénicos, se procedió a la caracterización in vitro de éstos mediante: patrones isoenzimáticos (zimodemos), efecto citopático en monocapa de células MDCK y patrones de restricción del DNA.

Los zimodemos obtenidos de nuestros aislados empleando el sistema de geles de poliacrilamida, están de acuerdo con lo reportado en la literatura respecto a la validez del sistema en poliacrilamida, ya que mejora la definición sin modificar el patrón de corrimiento enzimático (Matthews y col., 1983; Meza y col., 1986).

Correlacionamos los resultados obtenidos de la caracterización in vitro de los trofozoitos de E. histolytica con la procedencia de los aislados y las características clínicas de los individuos que las portaban. Los aspectos analizados en cada una de las cepas polixénicas se muestran en la tabla No. 2. Los datos considerados fueron: el origen (portador o sintomático) de los aislados, la respuesta inmune humoral del hospedero medida por Hemaglutinación Indirecta (HAI), el estudio

TABLA No. 2 . CORRELACION ENTRE CARACTERIZACION POR CRITERIOS CLINICOS
 Y CRITERIOS EXPERIMENTALES in vitro DE POLIXENICAS DE
Entamoeba histolytica

CEPA	ORIGEN	H.A.I. ^a	R.S.C. ^b	ZIMODEMO	FAGOCITOSIS CEL. MDCK (%)	PATRON DE RESTRICCIÓN (kph) ^c
HM:2	P.A. ^d	NEG.	N.R. ^e	I	0	0.7-0.9
HM:43	P.A.	NEG.	NORMAL	I	4	0.7-0.9
HM:44	P.A.	NEG.	NORMAL	I	5	0.7-0.9
HM:46	P.A.	NEG.	NORMAL	II	68	0.7-0.9
HM:4	Λ.I.A. ^f	1:64	N.R.	II	70	0.7-0.9
HM:50	Λ.I.A.	1:64	N.R.	XIV	0	0.7-0.9

a HEMAGLUTINACION INDIRECTA

e NO REALIZADO

b RECTOSIGMOIDOSCOPIA

f AMIBIASIS INTESTINAL AGUDA

c KILOPARES DE BASES

d PORTADOR ASINTOMÁTICO

EX

rectosigmoidoscópico (RSC), para corroborar la presencia o ausencia de lesiones de la mucosa intestinal del hospedero, por otra parte la caracterización de los aislados por patrones isoenzimáticos (Zimodemos), el efecto citopático en monocapa confluyente de células MDCK y los patrones de restricción del DNA.

Así pues, el patrón isoenzimático identificado como ZNP y la ausencia de efecto citolítico en monocapa de células MDCK en los aislados HM:2, HM:43 y HM:44 correlacionaron con la serología negativa medida por Hemaglutinación Indirecta (HAI) ya que fueron obtenidos de portadores asintomáticos. Dos individuos (correspondiente a los aislados HM:43 y HM:44), no presentaron evidencias de daño macroscópico en la mucosa colónica, determinado por rectosigmoidoscopia (RSC). Es importante mencionar la controversia generada alrededor de la validez de este parámetro de evaluación, debido a las limitaciones técnicas de este procedimiento (RSC), ya que las lesiones podrían tener localización en sitios fuera del alcance del observador (Pérez-Tamayo y Morer, 19__). Nuestros resultados para estos aislados, correlacionan con lo comunicado en la literatura, en la cual, los aislados obtenidos de individuos sin cuadro clínico ambiano, ausencia de lesiones macroscópicas determinadas por RSC y serología negativa (HAI), han mostrado que no son patógenas en animales de experimentación (Tanimoto-Weki y col., 1973), no dañan monocapa de células epiteliales (Martínez-Palomo y col., 1986) además de presentar un patrón isoenzimático característico (ZNP) (Sargeant y col., 1978, 1979, 1980). Los resultados

obtenidos con el aislado HM:4 proveniente de un paciente sintomático con serología positiva (HAI) también están de acuerdo con lo reportado por los mismos autores para aislados de E.histolytica de pacientes con amibiiasis invasora al presentar ZP y daño a monocapa de células MDCK.

Por otra parte, en dos de nuestros aislados (HM:50 y HM:46), los datos analizados no mostraron correlación entre el origen y la caracterización bioquímica. El aislado HM:50, obtenido de un paciente con amibiiasis intestinal aguda y serología positiva, presentó un patrón isoenzimático patógeno, (ZP) tipo XIV, reportado para la India por Sargeant y col. (1982). Hasta la fecha, no existen comunicaciones respecto al hallazgo de este tipo de zimodemo en nuestro país. El análisis del efecto citolítico a monocapa de células epiteliales, no mostró correlación con los datos de patogenicidad, pues hubo ausencia de lesión, comportándose como un aislado de zimodemo no patógeno. Esto evidencia la dificultad de caracterizar y correlacionar el comportamiento de aislados de E.histolytica obtenidos directamente de heces de portadores y sintomáticos ya que el modelo de efecto citopático en monocapa de células MDCK ha demostrado su utilidad como marcador de patogenicidad en cepas de E.histolytica mantenidas en cultivos axénicos (Orozco y col., 1975; Martínez-Palomo y col., 1986).

El aislado HM:46 obtenido de un portador asintomático con serología negativa y ausencia de lesiones macroscópicas mostradas por RSC mostró un ZNP al iniciarse el cultivo en medio de cultivo polixénico (Meza y col., 1986), y actualmente después de

numerosos pases en estos cultivos polixénicos, conservando la microbiota original con la que fue aislado, ha mostrado un cambio en su comportamiento bioquímico y fisiológico, al virar de zimodemo tipo I (ZNP) a zimodemo tipo II (ZF) y causar daño a monocapa de células MDCK, presentando una conducta propia de una cepa patógena. El cambio de zimodemo tipo I (no patógeno) a zimodemo tipo II (patógeno) en cepas de E.histolytica fue reportado anteriormente por Mirelman y col. (1986) confirmado por los estudios de Andrews y col., (1990). Sin embargo, no han sido reportados cambios en el comportamiento bioquímico (zimodemos) y fisiológico (Efecto citopático) asociados a patogenicidad de cepas de E.histolytica mantenidas en cultivos polixénicos con su microbiota original.

Se reconocen diversos factores que modifican el comportamiento in vitro de E.histolytica entre los que se incluye el mantenimiento prolongado en cultivos axénicos, tomado como responsable de la pérdida de virulencia (Philipps, 1954; Vincent y col., 1960); además, se sabe que la virulencia de las cepas crecidas axénicamente se ve aumentada en trofozoitos recuperados de abscesos hepáticos inducidos en animales de experimentación (Lushbaugh y col., 1978; Bos y col., 1979; Mattern y col., 1982; Das y col., 1976); también la virulencia aumenta con la adición de colesterol al medio de cultivo (Das y col., 1979; Westphal, 1937).

Se sugiere que el cambio de zimodemo podría ser resultado de: la interacción con su microbiota (Mirelman y col., 1986; Andrews y col., 1990); o del estrés al cual son sometidos los

trofozoitos durante el proceso de axenización (Sargeant y col., 1987) o bien, que el medio de cultivo axénico de Diamond seleccione preferentemente cepas patógenas (Diamond y col., 19__), aceptando la existencia de mezcla de cepas con diversas características en los aislados obtenidos directamente de heces. Sin embargo, no es posible aplicar estos criterios en aislados mantenidos en cultivos polixénicos con su microbiota, en los cuales se intentó mantener las condiciones microambientales originales.

Se estableció esta misma correlación con las cepas cultivadas en condiciones axénicas, consideradas como control para nuestro estudio (Tabla No. 3).

Las cepas HM:1-IMSS, HM:38-IMSS y HK:9-NIH originalmente aisladas de pacientes con amibiasis intestinal aguda presentaron zimodemo tipo II (Patógeno) y daño a monocapa confluyente de células MDCK (100, 85 y 80% respectivamente). Estos resultados están de acuerdo con lo comunicado en la literatura (Sargeant y col., 1978; Orozco y col., 1975; Martínez-Palomo y col., 1986). Estas 3 cepas presentaron también el doblete característico de la especie histolytica. Finalmente la cepa Laredo, aislada de acuerdo a la literatura, de un paciente con amibiasis intestinal aguda presentó un zimodemo que lo agrupa en la especie histolytica-like, no presentó daño a monocapa confluyente de células MDCK ni tampoco el patrón de restricción que lo caracterizaría como de la especie histolytica.

El polimorfismo en los patrones de restricción del DNA no identificó un patrón característico en los aislados de

TABLA No. 3 . CORRELACION ENTRE ORIGEN Y CARACTERIZACION EXPERIMENTAL
in vitro DE CEPAS AXENICAS DE Entamoeba histolytica

CEPA	ORIGEN	ZIMODEMO	FAGOCITOSIS CEL. MDCK (%)	PATRON DE RESTRICCION (kpb) ^{a1}
HM:1-IMSS	A.I.A. (1967) ^b	II	100	0.7-0.9
HM:38-IMSS	A.I.A. (1972)	II	85	0.7-0.9
HK:9-NIII	A.I.A. (1951)	II	80	0.7-0.9
Laredo	A.I.A. (1962)		0	0. -0.

a kilopares de bases

b Amibiasis intestinal aguda () año de aislamiento

13

E.histolytica obtenidos de portadores y pacientes sintomáticos, no permitiendo diferenciar cepas patógenas de no patógenas, sin embargo, es de significancia taxonómica e indica que los 6 aislados pertenecen a la especie histolytica ya que muestran el doblete común de 0.7 a 0.9 kpb, característico de esta especie y que se encuentra ausente en las especies no-histolytica, como fue demostrado en la cepa Laredo utilizada como control, de acuerdo a lo informado con Battacharya y col (1988) para cepas mantenidas en cultivos axénicos.

9. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se estandarizaron métodos para cultivo masivo de Entamoeba histolytica en condiciones polixénicas.
2. Se estandarizaron procedimientos de separación amiba/microbiota, el que mejor rendimiento dio fue el método de reducción gradual de almidón al medio.
3. En cuatro de los seis aislados estudiados hubo correlación entre el origen clínico de procedencia (RSC y HAI) y la caracterización experimental in vitro de los parásitos (Zimodemo, lisis de células MDCK).
4. El aislado HM:50, proveniente de un paciente con amibiasis intestinal aguda y serología positiva, presentó un tipo de zimodemo patógeno (XIV) no comunicado anteriormente para nuestro país.
5. El aislado HM:46 proveniente de portador y mantenido en cultivo polixénico con su microbiota original, presentó cambio de zimodemo no patógeno (I) a zimodemo patógeno (II).
6. El patrón de restricción del DNA de Entamoeba histolytica con la enzima EcoR1 no diferenció entre aislados provenientes de portadores y sintomáticos, sólo sirvió para fines taxonómicos (clasificación de especie).

10. ANEXOS

ANEXO No. 1

MEDIO TYI-S-33 PARA CULTIVO DE AMIBAS AXENICAS.

Para 1,000 ml de medio de cultivo, pesari:

Peptona biotriptasa	30.0 g
Dextrosa	10.0 g
Cloruro de sodio	2.0 g
KH_2PO_4	0.6 g
K_2HPO_4	1.0 g
L-cisteina	1.0 g
Acido ascórbico	0.2 g
Citrato férrico-amónico	0.03 g

Preparación:

Se afora con agua tridestilada y desionizada (conductividad < 0.1 omhs) hasta 820 ml. Se ajusta el pH a 6.8. Se pre-filtra en papel Watman No. 541 y 40, se filtra con pre-filtro Watman No. 541, 40 y la membrana Millipore de 0.45 μ m. Finalmente se esteriliza en autoclave a 15 lb/in² durante 20 minutos. La complementación del medio se lleva a cabo con suero de ternera o bovino inactivado y vitaminado.

Para inactivar el suero es necesario colocarlo en un baño de agua a 56°C durante 30 min, agitando suavemente y de manera constante. A cada 100 ml de suero (inactivado), se le añade 20

ml de solución de vitaminas de Diamond (Suero suplementado). Finalmente, a cada 100 ml de medio TYI-S-33 se le añade 20 ml del suero suplementado para tener el medio completo.

ANEXO No. 2

MEDIO DE ROBINSON PARA CULTIVO POLIXENICO DE E. histolytica

A. AGAR SALINO INCLINADO.

1. Pesar 1.5 g de agar noble
2. Disolver en 100 ml de agua destilada
3. Agregar 0.7 g de NaCl
4. Mezclar las soluciones y calentar en mechero hasta que se observe transparente
5. Distribuir en botellas de tapón de rosca de 7.0 ml de capacidad en alícuotas de 3.0 o 2.5 ml
6. Colocar las botellas en un cesto metálico y esterilizar en autoclave a 15 lb/in² durante 15 min con los tapones flojos. Cerrar las botellas y dejar enfriar en forma inclinada. Almacenar en refrigeración.

B. SOLUCION DE ERITROMICINA AL 0.5% (98% DE PUREZA)

Pesar 0.5 g de eritromicina base, disolver en 5 ml de etanol al 70% y dejar reposar por 2 h. Pasado este tiempo aforar a 98 ml

con agua destilada estéril helada. Repartir en botellas de 20 ml con tapón de rosca, en alicuotas de 10 ml y almacenar en congelación.

C. BACTOPEPTONA AL 20%

Disolver 20 g de bactopectona o peptona biotriptasa en 100 ml de agua destilada, mezclar calentando hasta disolverla, repartir en botellas de 20 ml con tapón de rosca, en alicuotas de 10 ml, esterilizar en autoclave a 15 lb/in² durante 15 min con los tapones flojos y almacenar en refrigeración.

D. ALMIDON DE ARROZ

Esterilizar de 2 a 3 g de almidón de arroz en frascos de boca ancha con tapón de rosca en autoclave a 15 lb/in² por 15 min. Posteriormente, pasar a un horno de 150°C durante 2.5 h. Almacenar a temperatura ambiente.

E. BIFTALATO

Solución 10 X.

1. Pesar 25.5 g de biftalato de potasio
2. Agregar 200 ml de agua destilada
3. Disolver el precipitado con NaOH al 40%
4. Ajustar el pH a 6.3 con NaOH al 40%
5. Completar a un volumen final de 250 ml
6. Alicuotar en botellas de 10 ml
7. Esterilizar en autoclave a 15 lb/in² por 15 min
8. Almacenar en refrigeración

Solución de trabajo 1 X.

Tomar 10 ml de la solución 10 X y diluir en 90 ml de agua bidesilada estéril. Almacenar en refrigeración.

F. MEDIO DEFINIDO "R" PARA CRECIMIENTO DE LA BACTERIA E.coli

Solución 10 X.

Cloruro de sodio	125.00 g
Acido cítrico	50.00 g
Fosfato monobásico de potasio	12.50 g
Sulfato de amonio	25.00 g
Sulfato de magnesio (7 H ₂ O)	1.25 g
Acido láctico (al 98%)	100.00 ml
Agua destilada	2.50 l

Preparación:

Disolver todos los componentes en 2 l de agua destilada. Aforar a 2.5 l. Distribuir en botellas de vidrio en alicuotas de 400 ml. esterilizar en autoclave a 15 lb/in² y almacenar en refrigeración.

Solución de trabajo 1 X.

1. Tomar 50 ml del medio "R" 10 X
2. Agregar 450 ml de agua destilada
3. Ajustar el pH a 7 con NaOH al 40%
4. Esterilizar en autoclave por 15 min

G. MEDIO AMIBIANO BASAL "BR"

Crece Escherichia coli silvestre por 48 h a 37°C en 500 ml de medio "R" y guardar a temperatura ambiente hasta por 2 meses (el pH no debe exceder de 7.3).

H. SUERO BOVINO Y PLASMA HUMANO

El suero bovino, clarificado y estéril (Microlab, S.A.), se descongeló y descomplementó a 56°C durante 30 min, posteriormente se almacenó a -20°C hasta su uso.

El plasma humano se obtuvo de plasmas humanos envejecidos, donados por el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea. Se descomplementó colocándolo a 56°C durante 30 min en baño de agua. Se centrifugó a 6,000 rpm para eliminar el exceso de grasa. Se mantuvo a -20°C hasta su uso.

I. MEDIO COMPLETO "BRS"

Mezclar volúmenes iguales de suero o plasma humano descomplementado y de medio "BR". Almacenar a temperatura ambiente.

J. MEDIO DE ROBINSON LIQUIDO COMPLETO

Para 1,000 ml de medio de Robinson líquido completo se mezclan 800 ml de biftalato 1 X, 200 ml de medio completo "BRS" y se disuelven 200 mg de almidón de arroz.

ANEXO No. 3

MEDIO BIFASICO DE BOECK Y DRBOHLAV

Preparación.

Se coloca el número de huevos requeridos en un matraz de 1,000 ml (que contiene pedacería de vidrio), se agita vigorosamente hasta obtener una mezcla homogénea, posteriormente se agrega un ml de sangre por cada huevo empleado y se agita nuevamente. A continuación se coloca un filtro (manta de cielo o gasa) y se pasa la mezcla. Se colocan aproximadamente 50 ml de la mezcla en matraces de 250 ml y se les fabrica un tapón con gasa.

Previamente se prepara el autoclave hasta llevarlo a la temperatura deseada (65°C), entonces se colocan los matraces durante 25 o 30 min (verificándose el momento en que ocurra la coagulación) y se dejan enfriar por 24 h. Finalmente se esteriliza a 15 lb de presión por 10 min con escape lento y se mantienen a 4°C hasta su uso.

SOLUCION DE RINGER

NaCl	9.00 g
KCl	0.20 g
CaCl ₂	0.20 g
Abe	1,000.00 cc

ANEXO No. 4

SOLUCIONES PARA REVELAR ACTIVIDAD ENZIMATICA

Enzima málica

1. 10 ml Trizma-HCl 1 M pH 7.4
2. 20 mg NADP⁺
3. 0.3 ml ácido málico 0.1 M
4. 10 ml MgCl₂ 0.1 M
5. 20 mg MTT
6. 4 mg PMS

Aforar a 100 ml con agua desionizada.

Hexocinasa

1. 10 ml Trizma-HCl 1M pH 7.4
2. 24 mg NADP⁺
3. 190 mg glucosa
4. 96 U Glucosa-6-P-deshidrogenasa
5. 7.6 ml MgCl₂ 0.1 M
6. 24 mg MTT
7. 4 mg PMS
8. 72 mg ATP

Aforar a 100 ml con agua desionizada

Fosfo glucomutasa

1. 10 ml Trizma-HCl 1 M pH 7.4
2. 10 mg NADP⁺
3. 200 mg glucosa-1-fosfato
4. 40 U glucosa-6-P-deshidrogenasa
5. 10 ml MgCl₂ 0.1 M
6. 20 mg MTT
7. 4 mg PMS

Aforar a 100 ml con agua desionizada

Glucosa fosfato isomerasa

1. 10 ml Trizma-HCl 1 M pH 8.0
2. 10 mg NADP⁺
3. 36 mg fructuosa-6-fosfato
4. 20 U glucosa-6-P-deshidrogenasa
5. 10 ml MgCl₂
6. 10 mg MTT
7. 4 mg FMS

Aforar a 100 ml con agua desionizada

ANEXO No. 5

SOLUCIONES PARA EXTRACCION DE DNA

Solución amortiguadora

Trizma base 1 M pH 8.0	100 µl
KCl 2.4 M	100 µl
MgCl ₂ 1 M	100 µl
Espermidina 60 mM	100 µl
N-etilmaleimida 50 µM	0.0626 mg/ml
DIFP 169.77 mM	117 µl
p-hidroximercuribenzoato 100 mM	100 µl

Las soluciones concentradas de cada uno de los componentes se preparan en agua bidestilada estéril (ABE) y se guardan a 4°C. La solución amortiguadora completa se prepara inmediatamente antes de utilizarse.

Solución NF-40 al 10%

Nonidet P-40	10.0 g
Agua bidestilada estéril	100.0 ml

Solución de sacarosa

Sacarosa 1 M	68.46 g
KCl 2.4 M	100.00 µl
MgCl ₂ 1 M	100.00 µl
Trizma base 1M pH 8	100.00 µl
Agua bidestilada estéril aforar a	100.00 ml

La solución se prepara al momento de utilizarse.

Solución de lisis

EDTA 0.5 M pH 8	16.81 g
Sarkosyl 1%	1.00 g
Proteinasa K 2mg/ml	100.00 µl
Agua bidestilada estéril aforar a	100.00 ml

Una vez preparada se puede almacenar a 4°C hasta su uso.

Reactivo de Sevaq

Cloroformo	96.0 ml
Alcohol isoamílico	4.0 ml

Una vez preparada se almacena a 4°C hasta su uso.

Etanol 70%

Etanol absoluto	70 ml
Agua bidestilada estéril	30 ml

Una vez preparado se almacena a 4°C

Etanol absoluto

Mantener a -20°C hasta su uso.

ANEXO No. 6

AMORTIGUADOR DE PREHIBRIDACION

SSC 20 X	2.5 ml
Formamida al 100%	5.0 ml
Solución Denhardt 100 X	0.5 ml
Buffer de fosfato de sodio 0.5 M pH 6.5	1.0 ml
DNAsss 10 mg/ml de salmón DNAsss	1.0 ml
Volumen total	10.0 ml

ANEXO No. 7

AMORTIGUADOR DE HIBRIDACION

SSC 20 X	2.5 ml
Formamida desionizada al 100%	5.0 ml
Solución Denhardt 100 X (ConcentraciOn final 1 X)	0.1 ml
Buffer de fosfato de sodio 0.5 M pH 6.5 (ConcentraciOn final 20 mM)	0.4 ml
Dextrán sodio sulfato al 50% (ConcentraciOn final de 10%)	2.0 ml
Volumen total	10.0 ml

ANEXO No. 8

SOLUCION DENHARDT

Ficoll	2.0 g
Polivinilpirrolidona (PVP)	2.0 g
Albúmina Sérica Bovina (BSA)	2.0 g
SSC 3X aforo a	100.0 ml

Se almacena en alicuotas a -20°C.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Andrews, B.J.; Mentzoni, L. Eijorvatn, B. (1990): Zymodeme conversion of isolates of Entamoeba histolytica. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84: 63
- Arroyo, R.; Drozco, E. (1986): Localization and identification of an Entamoeba histolytica adhesin. Mol. Biochem. Parasitol. 23: 151
- Avron, B.; Deutsch, R.M.; Mirelman, D. (1982): Chitin synthesis inhibitors prevent cyst formation by Entamoeba trophozoites. Biochem. Biophys. Res. Commun. 108: 815
- Bhattacharya, A.; Diamond, L. (1988): Comparison of repeated DNA from strain of Entamoeba histolytica and others Entamoeba. Mol. Biochem. Parasitol. 27: 257
- Bloomfield, A.L. (1957): A bibliography of internal medicine: amebic dysentery. J. Chronic Dis. 5: 235
- Borst, P.; Fase-Fowler, F.; Gibson, W.C. (1981): Quantitation of genetic differences between Trypanosoma brucei gambiense, rhodesiense and brucei by restriction enzyme analysis of kinetoplast DNA. Mol. Biochem. Parasitol. 3: 117
- Bos, H.J. (1979): Entamoeba histolytica: cytopathogenicity of intact amebae and cell free extracts; isolation and characterization of a intracellular toxin. Exp. Parasitol. 47: 369
- Bos, H.J.; Leinjendekker, W.J.; Van der Eijk, A.A. (1980): Entamoeba histolytica citopathogenicity, including serum effect on contact-dependent and toxin-induced lysis of hamster kidney cell monolayer. Exp. Parasitol. 50: 342
- Bracha, R.; Kobiler, D.; Mirelman, D. (1982): Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of Entamoeba histolytica. Infect. Immun. 36: 396
- Bracha, R.; Mirelman, D. (1984): Virulence of Entamoeba histolytica trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions and metronidazole. J. Exp. Med. 160: 353
- Calderón, J.; Tovar, R. (1986): Loss of susceptibility to complement lysis in Entamoeba histolytica HM-1 by treatment with human serum. Immunol. 58: 467
- Cereijido, M.; Ehrefeld, J.; Martínez-Palomo, A.; Meza, I. (1980): Structural and functional membrane polarity in cultured monolayer of MDCK cells. J. Membr. Biol. 52: 147

Chapman-Andresen, C. (1977): Endocytosis in freshwater amebas. *Physiol. Rev.* 57: 371

Das, S.R.; Ghoshal, S. (1976): Restoration of virulence to rat of axenically grown Entamoeba histolytica by cholesterol and hamster liver passage. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 70: 439

Das, A.U.; Padma, M.C.; Ishaq, M.; Habibullah, C.M. (1979): Amebiasis and prostaglandins. *Prostaglandins Med.* 2: 317

Dazzo, F.B.; Brill, W.J. (1977): Receptor site on clover and alfalfa roots for Rhizobium. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 132

Deas, J.E.; Miller, J.H. (1977): Plasmalemmal modifications of Entamoeba histolytica in vivo. *J. Parasitol.* 63: 25

De la Torre, M.; Landa, L.; Sepúlveda, B. (1970): Avances en los métodos para el cultivo de Entamoeba histolytica. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 1 (Supl.): s9

De la Torre, M.; De la Hoz, R.; Filloy, L. (1974): Cultivos axénicos de cepas mexicanas de Entamoeba histolytica HM-2:IMSS y HM_3:IMSS. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 5 (Supl. 2): 279

Diamond, L.S.; Mattern, C.F.T.; Bartgis, I.L. (1972): Viruses of Entamoeba histolytica. I. Identification of transmissible virus-like agents. *J. Virol.* 9: 326

Diamond, L.S.; Phillips, B.P.; Bartgis, I.L. (1974): A comparison of the virulence of nine strains of axenically cultivated entamoeba histolytica in hamster liver. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 5 (Supl. 2): 423

Diamond, L.S.; Harlow, D.R.; 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

Eaton, R.D.; Meerovitch, E.; Costerton, J.W. (1969): A surface active lysosome in Entamoeba histolytica. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63: 678

Eaton, R.D.; Meerovitch, E.; Costerton, J.W. (1970): The functional morphology of pathogenicity of Entamoeba histolytica. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 64: 299

Edman, U.; Meza, I.; Agabian, N. (1987): Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of Entamoeba histolytica. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 3024

Editorial (1986): On three stages of amoebic research. *Lancet.* ii: 1133

Estévez, M. L. (1990): Comunicación personal

Gadasi, H.; Kessler, E. (1983): Correlation of virulence and collagenolytic activity in Entamoeba histolytica. Infect. Immunol. 39: 528

Gelderman, A.H.; Bartgis, F.L.; Keister, D.B. (1971): A comparison of genome size and thermal denaturation derived base composition of DNAs from several members of Entamoeba histolytica group. J. Parasitol. 57: 921

González-Robles, A.; Martínez-Falomo, A. (1983): Scanning electron microscopy of attached trophozoites of pathogenic Entamoeba histolytica. J. Protozool. 30: 692

Guarner, V. (1990): History of amebiasis. In amebiasis infection and disease by Entamoeba histolytica In: Kretschmer, R.R. (edit.) CRC Press: 1

Guerrant, R.L.; Brush, J.; Raydin, J.I.; Sullivan, J.A.; Mandell, G.L. (1981): Interaction between Entamoeba histolytica and human polymorphonuclear neutrophils. J. Infect. Dis. 143: 83

Hernández-López, H.R.; Escobedo-Salina, A. (1970): Producción de abscesos hepáticos amebianos en el hámster bajo diversas condiciones de experimentación. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1 (Supl. 1): s124

Huber, M.; Garfinkel, L.; Gitler, C.; Mirelman, D.; Revel, M.; Rozenblatt, S. (1987): Entamoeba histolytica: cloning and characterization of actin cDNA. Mol. Biochem. Parasitol. 24: 227

Huber, M.; Koller, B.; Gitler, C.; Mirelman, D.; Revel, M.; Rozenblatt, S.; Garfinkel, L. (1989): Entamoeba histolytica ribosomal genes are carried on palindromic circular DNA molecules. Mol. Biochem. Parasitol. 32: 285

Jackson, T.F.H.G.; Sargeant, P.G.; Williams, J.E.; Simjee, A.E. (1982): Observations on zymodeme studies of Entamoeba histolytica in Durban, South Africa. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl. 3): 83

Jackson, P.R.; Wohlhieter, J.A.; Jackson, J.E.; Sayles, P.; Diggs, C.L.; Hockmeyer, W.T. (1984): Restriction endonuclease analysis of Leishmania kinetoplast DNA characterizes parasites responsible for visceral and cutaneous disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33: 808

Jarumilinta, R.; Maegraith, B.G. (1969): Enzymes of Entamoeba histolytica. Bull. W.H.O. 41: 269

Jiménez, E.; Kumate, J. (1982): Correlación clínica de zimodemos de Entamoeba histolytica Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl. 3): 77

Jonckheere, J.F. (1987): Characterization of Naeoileria species by restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. Mol. Biochem. Parasitol. 24: 55

Kasuko-Kawashima, F.K.; Tanimoto-Weki, M.; De la Torre, M.; González-Sánchez, S. (1973): Estudio comparativo de cepas patógenas y no patógenas de Entamoeba histolytica con microscopía de luz y reacciones de inmunofluorescencia. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4 (Supl.) s11

Keene, W.E.; Pettit, M.G.; Allen, S. (1986): The major neutral proteinase of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 163: 536

Kobiler, D.; Mirelman, D. (1980): Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. Infect. Immun. 29: 221

Kudo, R.R. (1969): Protozoología. 4a. ed. Edit. CECSA, México, pp. 417

Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, F.E.G.; Derour, G.; Grain, J.; Honigberg, B.M.; Leedale, G.F.; Loeblich, A.R.; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E.G.; Page, E.C.; Poljansky, G.; Sprague, V.; Vavra, J.; Wallace, F.G. (1980): A newly revised classification of the Protozoa. J. Protozool 27(1): 37

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

Long-Krong, S.A.; Fisher, K.G.; Hysmith, R.M. (1985): Phospholipase A enzymes of Entamoeba histolytica. Description and subcellular localization. J. Infect. Dis. 152: 536

López-Revilla, R.; Gómez, R. (1978): Entamoeba histolytica, Entamoeba invadens and Entamoeba moshkovskii: fluctuations of the DNA content of axenic trophozoites. Exp. Parasitol. 44: 243

López-Revilla, R.; Said-Fernández, S. (1980): Cytopathogenicity of Entamoeba histolytica: hemolytic activity of trophozoites homogenates. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29: 209

Luaces, A.L.; Barret, J. (1988): Affinity purification and biochemical characterization of histolysine, the major cysteine proteinase of Entamoeba histolytica Biochem. J. 250: 903

Lundbland, G.; Hultdt, G.; Elander, M. (1981): β -N-Acetylglucosaminidase from Entamoeba histolytica. Comp. Biochem. Physiol. (B) 68: 71

Lushbaugh, W.B.; Kairalla, A.B.; Loadholt, C.B.; Pittman, F.E. (1978): Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27: 248

Lushbaugh, W.B.; Hofbauer, A.F.; Pittman, F.E. (1984): Proteinase activities of Entamoeba histolytica cytotoxin. Gastroenterology 87: 17

Lushbaugh, W.B.; Hofbauer, A.F.; Pittman, F.E. (1985): Entamoeba histolytica: purification of cathepsin. B. Exp. Parasitol. 59: 328

Maegraith, B.G.; Harinasuta, C. (1954a): Experimental amoebic infection of the liver in guinea pigs. I. Infection via the mesenteric vein and via the portal vein. Ann. Trop. Med. Parasit. 48: 421

Maegraith, B.G.; Harinasuta, C. (1954b): Experimental amoebic infection of the liver in guinea pigs. II. Abscess formation in animal with persistent intestinal lesions. Ann. Trop. Med. Parasit. 48: 434

Martínez-Baez, M. (1976): Historia de la amibiasis. In: Amibiasis, Sepúlveda, B. and Diamond, L.S. (edits.) Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis, México, D.F. organizado por el Centro de estudios sobre Amibiasis pag. 42

Martínez-Palomo, A.; González-Robles, A.; De la Torre, M. (1973): Selective agglutination of pathogenic strains of Entamoeba histolytica induced by Con A. Nature N. Biol. 245: 186

Martínez-Palomo, A. (1982): Cell Biology. In: The biology of Entamoeba histolytica. Research Studies Press, John Wiley and sons, Ltd, Sussex, England: 5

Martínez-Palomo, A.; González-Robles, A.; Chávez, B. (1985): Structural bases of the cytolytic mechanism of Entamoeba histolytica. J. Protozool. 32(1): 166

Martínez-Palomo, A. (1986): Biology of Entamoeba histolytica. In: Amebiasis. Martínez-Palomo, A. (edit.) Amsterdam Elsevier Biomedical. 11

Martínez-Palomo, A. (1987): The pathogenesis of amoebiasis. Parasit. Today 3(4): 111

Martínez-Reyes, R.; González-Pacheco, R.; Gómez-Reyes, I.; De la Torre, M.; Sepúlveda, B. (1980): Inducción de inmunidad antiamebiásica en primates subhumanos con antígeno lisosomal de Entamoeba histolytica: VI. Inoculación intrahepática de Entamoeba histolytica virulenta en monos. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11 (Supl. 1): 267

Mathews, H.M.; Moss, D.M.; Healy, G.R.; Visvesvara, G.S. (1983): Polyacrilamide gel electrophoresis of isoenzymes from Entamoeba species. J. Clin. Microbiol. 17: 1009

Mattern, C.F.T.; Keister, D.B. (1977): Experimental amebiasis: II. Hepatic amebiasis in the newborn hamster. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 402

Mattern, C.F.T.; Keister, D.B.; 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.; Natovitz, P.C. (1982): Virulence of Entamoeba histolytica upon continuous axenic cultivation. Arch. Invest. Méd. (Mèx.) 13 (Supl. 3): 185

Mc Laughlin, J.; Aley, S. (1985): The biochemistry and functional morphology of the Entamoeba. J. Protozool. 32: 221

Meza, I.; De la Garza, M.; Meraz, M.A.; Gallegos, B. and col. (1986): Isoenzyme patterns of Entamoeba histolytica isolates from asymptomatic carriers: use of gradient acrylamide gels. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35: 1134

Meza, I.; Cazares, F.; Rosales-Encina, J.L.; Talamás-Rohana, P.; Rojkind, M. (1987): Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton protein from Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 156: 798

Meza, I.; Torres, H.K.; Meraz, M.A. (1990): Molecular organization of Entamoeba histolytica In: Amebiasis: Infection and disease by Entamoeba histolytica. Kretschmer, R.R. (edit.) CRC Press. 19

Mirelman, D.; Bracha, R.; Chayen, A.; Aust-Kettis, Diamond, L.S. (1986): Entamoeba histolytica: Effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzymes patterns and virulence. Exp. Parasitol. 62: 142

Mirelman, D. (1987a): Ameba-bacterium relationship in amebiasis. Microbiol. Rev. 51: 272

Mirelman, D. (1987b): Effect of culture conditions and bacterial associates on the zymodemes of Entamoeba histolytica. Parasitol. Today 3: 37

Morel, C.; Chiari, E.; Plessmann-Camargo, E.; Mattei, D.M.; Romanha, A.J.; Simpson, L. (1980): Strains and clones of Trypanosoma cruzi can be characterised by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA mini-circles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 6810

Müller, F.; Franz, A.; Werries, E. (1988): Secretory hidrolases of Entamoeba histolytica. J. Protozool 35: 291

Muñoz, M.L.; Calderón, J.; Rojkind, M. (1982): The collagenase of Entamoeba histolytica. J. Protozool. 35: 291

Muñoz, M.L.; Rojkind, M.; Calderón, J. (1984): Entamoeba histolytica: Collagenolytic activity and virulence. J. Protozool. 3: 468

Neal, R.A. (1960): Enzymic proteolysis by Entamoeba histolytica: biochemical characteristics and relationship with invasiveness. Parasitology 50: 531

Grozco, E.; Martínez-Palomo, A.; López-Revilla, R. (1978): Un modelo in vitro para el estudio cuantitativo de la virulencia de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9(Supl.1): 257

Grozco, E.; Suárez, M.; Sánchez, T. (1985): Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from Entamoeba histolytica, strain HM-1:IMSS. Int. J. Parasitol. 15: 655

Fanyim, S.; Wilairat, F.; Yuthavong, Y. (1985): Application of genetic engineering to research on tropical disease pathogens with special reference to plasmodia. A laboratory manual of selected techniques. From an International Laboratory workshop sponsored by the UNDP/WORLD BANK/WHO special programme for research and training in tropical diseases and Mahidol University, Bangkok, Thailand.

Pérez-Fuentes, R. (1990) Comunicación personal

Pérez-Tamayo, R.; Becker, I.; Monfort, I.; Pérez-Monfort, R. (1990): Pathobiology of amebiasis. In: Amebiasis: infection and disease by Entamoeba histolytica. Kretschmer, R. R. (edit.) CRC Press. pp. 123

Phillips, B.P. (1973): Entamoeba histolytica: concurrent irreversible loss of infectivity/pathogenicity and encystment potential after prolonged maintenance in axenic culture in vitro. Exp. Parasitol. 43: 163

Proctor, E.M.; Gregory, M.A. (1972): The observation of a surface active lysosome in the trophozoites of Entamoeba histolytica from the human colon. Ann. Trop. Med. Parasitol. 66: 339

Ravdin, J.I.; Guerrant, R.L. (1980): Studies on the cytopathogenicity of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) II (Supl.1): 123

Ravdin, J.I.; Guerrant, R.L. (1981): The role of adherence in cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. Study with mammalian tissue culture cells and human red blood cells. J. Clin. Invest. 68: 1305

Ravdin, J.I.; Guerrant, R.L. (1982): A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. Rev. Infect. Dis. 4: 1185

Ravdin, J.I.; John, J.E.; Johnston, L.I.; Innes, D.I.; Guerrant, R.L. (1985): Adherence of Entamoeba histolytica trophozoites to rat and human colonic mucosa. *Infect. Immun.* 48: 292

Ravdin, J.I. (1984): Pathogenesis of disease caused by Entamoeba histolytica. Studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* 8: 247

Reed, S.L. (1988): Comunicación personal.

Reeves, R.E.; Bischoff, J.M. (1968): Classification of Entamoeba species by means of electrophoretic properties of amebal enzymes. *J. Parasitol.* 54: 594

Robinson, G.L. (1968): The laboratory diagnosis of human parasitic amoeba. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62: 285-294

Rosales-Encina, J.L.; Meza, I.; López de León, A.; Talamás-Rohana, P.; Rojkind, M. (1987): Isolation of a 220 kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of Entamoeba histolytica. *J. Infect. Dis.* 156: 79

Rosenberg, I.; Gitler, C. (1985): Subcellular fractionation of amoebapore and plasma membrane components of Entamoeba histolytica using self-generating percoll gradients. *Mol. Biochem. Parasitol* 14: 231

Ross, G.W.; Knight, R. (1973): Dietary factor affecting the pathogenicity of Entamoeba histolytica in rats. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67: 560

Samuelson, J.; Acuna-Soto, R.; Reed, S.; Biagi, F.; Wirth, D. (1989): DNA hybridization probe for clinical diagnosis of Entamoeba histolytica. *J. Clin. Microbiol.* 27 (4): 671

Sargeant, P.G.; Williams, J.E.; Greene, J.D. (1978): The differentiation of invasive and non-invasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72: 519

Sargeant, P.G.; Williams, J.E.; Kumate, J.; Jiménez, E. (1980a): The epidemiology of Entamoeba histolytica in México city. A pilot survey I. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74 (5): 653

Sargeant, P.G.; Williams, J.E.; Neal, R.A. (1980b): A comparative study of Entamoeba histolytica (NIH:200, HK-9, etc.), Entamoeba histolytica-like and other morphologically identical amoebae using isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74: 469

Sargeant, P.G.; Williams, J.E.; Bhojnani, R.; Campos, J.E.; Gómez, A. (1982a): The epidemiology of Entamoeba histolytica in rural and urban area of Mexico. A pilot survey II. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76: 208

Sargeant, P.G.; Williams, J.E.; Bhojnani, R.; Kumate, J.; Jiménez, E. (1982b): A review of isoenzyme characterization of Entamoeba histolytica with particular reference to pathogenic and non-pathogenic stocks isolated in México. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl.3): 89

Sargeant, P.G.; Baveja, V.K.; Nanda, R.; Anand, B.J. (1984): Influence of geographical factors in the distribution of pathogenic zymodemes of Entamoeba histolytica: Identification of zymodeme XIV in India. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 78: 96

Sepúlveda, B.; Martínez-Palomo, A. (1984): Amebiasis. In: Warren, K.S.; Mahmoud, A.A.F. (Eds.) Tropical and Geographical Medicine, McGraw-Hill, New York. pp. 305

Sepúlveda, B.; Treviño García-Manzo, N. (1986): Clinical manifestations and diagnosis of amoebiasis. In: Amebiasis. Martínez-Palomo A. (edit.) Elsevier, Amsterdam, 170

Singh, B.N.; Srivastava, R.V.N.; Dutta, G.P. (1971): Virulence of strains of Entamoeba histolytica of rat and the effect of cholesterol, rat caecal and hamster liver passage on the virulence of noninvasive strains. Indian J. Exp. Biol. 9: 21

Solis, F. (1990): Comunicación personal.

Stillwell, G. (1955): Amebiasis. Its early history. Gastroenterology 26: 606-

Strachan, W.D.; Chiadini, P.L.; Spice, W.M.; Moody, A.H.; Ackers J.P. (1988): Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of Entamoeba histolytica. Lancet i: 561

Takeuchi, A. Phillips, B.P. (1975): Electron microscope studies of experimental Entamoeba histolytica infection in the guinea pig. I. Penetration of the intestinal epithelium by trophozoites. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24: 34

Tanimoto-Weki, M.; Cortés, A.; Vázquez-Saavedra, J.A.; Calderón-Lara, P.; Aguirre-García, J. (1973): Inmunidad consecutiva a la inyección de antígeno axénico en el hámster. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4 (Supl.1): 147

Tobie, J.E. (1979): Experimental infection by the rabbit with Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 73: 225

Torres-Guerrero, H.K. (1990): Comunicación personal.

Treviño García-Manzo, N.; Castañeda, M.; González-Angulo, A. (1973): Comparación entre los trofozoitos de Entamoeba histolytica procedentes de portadores asintomáticos y los obtenidos de pacientes con lesiones amebianas. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4 (Supl.): 17

Treviño García-Manzo, N. (1990): Clinical spectrum of amebiasis in adults. In: Amebiasis: infection and disease by Entamoeba histolytica. Kretschmer, R. R. (ed.) CRC Press. pp. 191

Trissl, D.; Martínez-Palomo, A.; Argüello, C.; De la Torre, M.; De la Hoz, R. (1977): Surface properties related to Concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several Entamoeba strains. J. Exp. Med. 145: 652

Trissl, D.; Martínez-Palomo, A.; De la Torre, M.; y col (1978): Surface properties of Entamoeba: Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. J. Exp. Med. 148: 1137

Trissl, D. (1983): Glycosidases of Entamoeba histolytica. Z. Parasitenkd. 69: 291-298

Tsutsumi, V.; Mena-López, R.; Anaya-Velazquez, F.; Martínez-Palomo, A. (1984): Cellular basis of experimental amebic liver abscess formation. Am. J. Pathol. 117: 81

Walsh, J.A. (1986): Problems in recognition and diagnosis of amebiasis estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8: 228

Werries, E.; Nebinger, F.; Franz, A. (1983): Degradation of biogenic oligosaccharides by β -N-acetylglucosaminidase secreted by Entamoeba histolytica. Mol. Biochem. Parasitol. 7: 127-140

Young, J.D.; Young, T.M.; Lu, P.L. (1982): Characterization of a membrane pore-forming protein from Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 156: 1677