



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO

PROYECTO ACADEMICO DE LICENCIATURA, MAESTRIA
Y DOCTORADO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE ENTAMOEBA
HYSTOLITICA Y ENTAMOEBA INVADENS:
PROTEINASAS Y ACCION CITOTOXICA
IN VITRO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

JOSE ENGELMAYER ZAND

México, D. F.

Octubre de 1991

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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

	PAG.
ABREVIATURAS.....	1
1 INTRODUCCION	
1.1 Amibiasis: Perspectiva General.....	3
I. Definición y Epidemiología.....	3
II. Historia.....	5
1.2 Biología Celular de <i>E. histolytica</i>	7
I. Ciclo Biológico y Estructura Celular.....	7
II. Metabolismo.....	9
1.3 Mecanismos de Agresión de <i>E. histolytica</i>	10
I. Adherencia.....	10
II. Citólisis y Muerte Celular.....	12
III. Fagocitosis.....	13
IV. Proteinasas.....	14
V. Resistencia Amibiana.....	20
VI. Amiboporo.....	27
VII. Fosfolipasas.....	28
VIII. Conclusiones de la Sección 1.3.....	29
1.4 Mecanismos de Defensa del Huésped.....	32
I. Mecanismos No Inmunes.....	32
II. Respuesta Inmunoceular.....	33
III. Respuesta Humoral.....	35
IV. Complemento y Lizosima.....	36
1.5 Virulencia de <i>E. histolytica</i>	38
I. Virulencia, Patogenicidad y Medición.....	38
II. Factores de Virulencia.....	39
III. Adquisición de Virulencia.....	40
IV. Mecanismo Inductor de la Virulencia Amibiana...	42

	PAG.
1.6 Objetivos.....	44
2 MATERIALES Y METODOS	
I. Cultivos Axénicos Ambianos.....	47
II. Animales.....	47
III. Actividad Proteolítica.....	47
IV. Coincubaciones.....	49
V. Estadística.....	51
3 RESULTADOS	
3.1 Proteinasa.....	52
3.2 Acción Citotóxica In Vitro.....	64
4 DISCUSION	
4.1 Proteinasa.....	75
I. Similitudes.....	75
II. Diferencias.....	77
4.2 Acción Citotóxica In Vitro.....	78
I. La Fagocitosis como Mecanismo Agresor.....	78
II. Receptor Principal de la Fagocitosis.....	80
III. Diferencias con otros Sistemas.....	83
IV. Fagocitosis y Virulencia.....	85
4.3 Receptocinesis.....	87
I. Teoría Acerca de un Mecanismo de Muerte Celular.....	87
II. Validez de la Teoría.....	95
III. Pruebas de la Teoría de Receptocinesis....	98
IV. Receptocinesis como Mecanismo General.....	99

PAG.

V. Activación de la Receptocinesis..... 101

5 CONCLUSIONES

REFERENCIAS..... 106

ABREVIATURAS

E.: Entamoeba
AH: variante productora de abscesos hepáticos
No-AH: variante no productora de abscesos
E.i.: Entamoeba invadens
célula CHO: de ovario de hamster chino
célula o neutrófilo PMP: Polimorfonuclear
célula PBM: mononuclear de sangre periférica
célula NK: linfocitos citotóxicos inespecíficos
célula MDCK: epitelial de riñón canino Madin-Darby
célula BRH: de riñón de hamster neonato
célula T8: linfocitos T8 citotóxicos
MPr: macrófago peritoneal de rata
DNA: ácido desoxirribonucleico
Ca++: ion calcio
Gal: galactosa
GlcNac: N-acetil-glucosamina
GalNac: N-acetil-galactosamina
Con A: concanavalina A
PHA: fitohematoglutinina
DTT: ditioneitol
LFA: antígenos asociados a funciones de linfocito
CD2: grupo de diferenciación 2
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
PM: peso molecular
hr: horas
ml: mililitros
ul: microlitros
mm: micrómetros
min: minutos
Kd: kilodaltones
g: gramos
ua: unidades de absorbencia

rpm: revoluciones por minuto

pI: punto isoeléctrico

Nota: las abreviaturas de los inhibidores de proteinasas se encuentran en la sección de Materiales y Métodos (2.2.III).

1 INTRODUCCION

1.1 Amibiasis: Perspectiva General

I. Definición y Epidemiología

La amibiasis es la infección en el hombre y ciertos primates en cautiverio provocada por el protozooario Entamoeba Histolytica. Esta especie vive generalmente como un comensal en la luz del intestino grueso (amibiasis luminal), pero puede invadir la mucosa intestinal y producir disentería o ameboma; a -- través de diseminación sanguínea puede causar lesiones extraín testinales, particularmente en el hígado (Martínes-Palomo - -- 1982).

E. histolytica está distribuida mundialmente y ocupa el - tercer lugar como causa de muerte por parásitos, después de la malaria y la esquistosomiasis. E. histolytica infecta aproximádamamente al 10% de la población mundial, y se manifiesta como 40 a 50 millones de casos de colitis invasiva o abscesos hepáticos y 40,000 a 110,000 muertes por año (Walsh 1988) (Tabla I). Las fuentes más comunes de infección son tratamiento inadecuado de desagüe, contaminación fecal de la fuente de agua, y falta de higiene personal de trabajadores del servicio de alimentación (Lushbaug y Miller 1988a, Walsh 1988). Otros factores

TABLA I

Prevalencia e Incidencia Mundial de Amibiasis en 1984

Continente	Infecciones	Enfermedad (Absceso y Colitis)	Muertes
América del Norte y Sur	95×10^6	10×10^6	$10-30 \times 10^3$
Asia	300×10^6	$20-30 \times 10^6$	$20-50 \times 10^3$
Africa	85×10^6	10×10^6	$10-30 \times 10^3$
Europa	20×10^6	$.1 \times 10^6$	-
T o t a l	500×10^6	$40.1-50.1 \times 10^6$	$40-110 \times 10^3$

Prevalencia mundial e incidencias de amibiasis en 1984. Tomado de Walsh 1988.

de riesgo son el hacinamiento, los cambios de clima, de medio ambiente y ciertas prácticas sexuales (Walsh 1988).

II. Historia

La amibiasis se manifestó desde tiempos antiguos, pero no fue sino hasta 1873 que Fedor Aleksandrovich Lösch, en San Petersburgo (ex Leningrado), Rusia, descubrió la causa de la amibiasis. Lösch describió detalladamente los numerosos parásitos encontrados en las heces fecales de un granjero de 24 años a los que consideró la causa de la enfermedad. Luego de la autopsia, describió las úlceras y lesiones de la submucosa en las que se identificaron los parásitos y, posteriormente, provocó disentería y ulceraciones con amibas en un perro que recibió heces infectadas del paciente por vía oral y rectal. Quinke y Roos en 1893 descubrieron que la fuente de agua es un medio de transmisión de la enfermedad y que los síntomas correlacionaban con el número de amibas. También describieron al quiste como una forma amibiana de mayor resistencia y, con gatos como su modelo experimental, encontraron que sólo el quiste podía producir disentería por vía oral. Estos investigadores descubrieron la existencia de amibas más grandes, menos móviles, más granulares, más resistentes a la desecación, que no producían enfermedad y que a menudo se encontraban en individuos sanos, por lo que establecieron de esta manera la primera distinción entre E. histolytica y E. coli. En 1903, Schaudinn las denominó con sus nombres actuales, y Huber hizo la observación importante de que los quistes de las amibas patogénicas podían tener uno, dos, o cuatro núcleos pero nunca más, a diferencia de las "amibas ordinarias" (Kean 1988).

La descripción de la patología de la amibiasis, así como el establecimiento de la relación entre amibiasis intestinal y absceso hepático amibiano, fueron hechos por Councilman y Laflaur en 1891. En 1913, Walker y Sellards, en una serie de

experimentos bien controlados en los que utilizaron voluntarios de la prisión Bilibid en Manila, establecieron: a) La importancia de estudiar diferentes cepas del mismo organismo, -- b) que la virulencia cambia con pasos por una serie de huéspedes, c) que el mismo organismo puede ser patogénico en algunos individuos y en otros no causar enfermedad, y d) que un acarreador asintomático puede ser responsable de la transmisión de un parásito que es patogénico en otros individuos. Además, enfatizaron las diferencias entre E. histolytica y E. coli en cuanto a apariencia, forma del quiste y patogenicidad. Clifford Dobell, en 1928, aportó la descripción definitiva del quiste y de la forma vegetativa de E. histolytica (Kean 1988).

La corteza de ipecac (proveniente de la planta ipecacuanana), utilizada por mucho tiempo en Perú para el tratamiento de disenterías, fue introducida en Europa en 1658 por Piso. La apreciación por Vedder (1911) de que un alcaloide, la emetina, era el ingrediente terapéutico esencial del ipecac en polvo, permitió el refinamiento de la droga a una forma inyectable. En 1944 Craig se dió cuenta de que la emetina, a pesar de su alta toxicidad para el parásito in vitro, no curaba la amibiasis intestinal si se utilizaba sola. El abogó por el uso de compuestos con ioduro como es el quiniofón o arsenicales como la carbasona para eliminar los quistes (Kean 1988).

Durante las últimas décadas, el número de investigaciones sobre amibiasis se ha incrementado debido a la introducción, en 1968, del primer método práctico para cultivar a E. histolytica axénicamente (sin microorganismos adicionales) y su perfeccionamiento en 1978 por Diamond (Diamond 1968, Diamond et al. 1978). Sin embargo, el conocimiento actual es aún incompleto en cuanto a la biología celular y molecular del parásito, mecanismos de agresión, mecanismos de defensa del huésped e inmunidad protectora, y finalmente, determinación y adquisición de la virulencia en la amiba (Martínez-Palomo 1982, 1986). A

continuación se proporciona un análisis de la perspectiva actual de las áreas mencionadas.

1.2 Biología Celular de E. histolytica

I Ciclo Biológico y Estructura Celular

Al parásito encontrado en los tejidos y en la luz del intestino se le llama trofozoito, el cual representa el estadio móvil. Los trofozoitos de E. histolytica tienen un diámetro de 10 a 60 μm , presentan un sólo núcleo, y se mueven a través de pseudópodos que se forman de extrusiones redondas y cristalinas del citoplasma denominadas lobopodios. El núcleo esférico contiene un pequeño cariósoma central rodeado de un halo transparente que se extiende hasta la membrana nuclear; la membrana nuclear está cubierta interiormente por gránulos de cromatina que en ocasiones se agregan. El citoplasma, además del núcleo, se compone principalmente de vacuolas endocíticas y digestivas, cuerpos cromatóides y vesículas membranosas más pequeñas. La parte posterior de varios trofozoitos lleva un copeete de filopodios tubulares largos y cortos llamado uroide. El plasmalema presenta asimismo una gran variedad de filopodios con funciones de pegado y posiblemente de secreción. (Lushbaugh y Miller 1988a).

Los trofozoitos no desempeñan ningún papel en la transmisión de la enfermedad sino que son responsables de la patología del tejido; la desecación, inmersión en agua o digestión estomacal ácida los destruyen rápidamente. Sin embargo, bajo condiciones desconocidas, los trofozoitos intestinales pueden formar quistes con una pared celular, probablemente de quitina, que les permite ser altamente resistentes a la tensión ambiental y permanecer viables por varias semanas en condiciones húmedas (Lushbaugh y Miller 1988a, Walsh 1988, Martínez-Palomo 1986). Los quistes tienen un diámetro de 10 a 20 μm . Los pre

quistes o quistes inmaduros presentan un núcleo y su citoplasma puede contener gránulos de glucógeno que se tiñen con yoduro. Al madurar los quistes, su núcleo se divide dos veces y forma un máximo de cuatro núcleos más pequeños. Durante este proceso se consume parte del glucógeno (Lushbaugh y Miller - 1988a).

El reservorio de la infección humana es el "portador" o huésped asintomático quien accidentalmente introduce quistes en alimentos o son ingeridos debido a falta de higiene (Lushbaugh y Miller 1988a, Walsh 1988). Cuando los quistes alcanzan el intestino grueso liberan una amiba con cuatro núcleos que, por una serie de divisiones nucleares, aporta un sólo núcleo para cada uno de los 8 trofozoitos hijos (Neal 1988, Lushbaugh y Miller 1988a). Los trofozoitos móviles se adhieren a la superficie del intestino, básicamente en áreas de estasis del colon, proliferan por división asexual y producen una infección que puede o no desarrollar características invasivas sintomáticas (Lushbaugh y Miller 1988a, Walsh 1988).

E. histolytica parece ser un eucariote primitivo que a diferencia de otros carece de un citoesqueleto estructurado, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y mitocondrias (Martínez-Palomo 1986). Funcionalmente el retículo endoplasmático rugoso se halla sustituido por un sistema helicoidal de ribosomas. Las hélices se agrupan en disposiciones cristalinas mayores y forman los cuerpos cromatoides de los quistes maduros. El retículo endoplásmico liso podría estar sustituido por el sistema vacuolar de la amiba (Lushbaugh y Miller 1988a). El sistema lisosomal parece estar integrado por dos tipos de lisosomas secundarios además de lisosomas primarios (Gitler y Mirelman - 1986).

II. Metabolismo

Aparentemente E. histolytica degrada la glucosa a piruvato por la vía clásica de Embden-Meyerhoff; sin embargo, debido a que el parásito carece de lactato deshidrogenasa, el lactato no es un producto final. Además, el pirofosfato inorgánico -- sustituye al adenosín trifosfato (ATP) en varias reacciones -- glucolíticas. La glucólisis puede proceder tanto anaeróbicamente como aeróbicamente y forma acetato, etanol y CO₂ como -- productos finales.

Anaeróbicamente, la producción de etanol excede a la de acetato por una razón de 3:1, mientras que aeróbicamente, la -- relación se invierte, y en algunas circunstancias no se forma etanol. Una característica única del metabolismo aeróbico de la E. histolytica es la ausencia de proteínas hémicas y del ciclo del ácido tricarboxílico funcional; en cambio, varias proteínas no hémicas y de hierro-azufre se hallan presentes y son funcionales. El transporte electrónico parece no estar acoplado a la síntesis de ATP; de aquí la importancia metabólica del piruvato, que aeróbicamente puede ser oxidado por una vía fosforilativa para dar lugar a 2 moles de ATP por cada mol de glucosa degradada (Weinbach 1988).

Aunque la E. histolytica posee superóxido dismutasa, que detoxifica el anión superóxido (O₂⁻) para formar peróxido de hidrógeno (H₂O₂), carece de catalasa, que detoxifica el H₂O₂ -- al formar agua (H₂O), y de glutatión, que intervienen en la -- protección contra la toxicidad del oxígeno (Weinbach 1988). -- Sin embargo, la detoxificación de H₂O₂ podría llevarse a cabo por la reductasa superficial de la amiba (Mogyoros et al 1989).

1.3 Mecanismos de agresión de E. histolytica

I. Adherencia

La adherencia es de vital importancia para la amiba, ya que es el primer paso de su capacidad invasiva en procesos tales como: adhesión de bacterias, que proveen nutrición e incremento de la virulencia; adhesión al epitelio colónico, para colonización o inicio de la invasión; adhesión a leucocitos y -- otros tejidos del huésped, que resultan en citólisis y fagocitosis (Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1988b, Martínez-Palomo 1982, Martínez-Palomo et al. 1989).

Varias lectinas superficiales han sido descritas para E. histolytica. La primera es la lectina inhibida por galactosa o N-acetil-galactosamina (lectina Gal/GalNac), la cual media la adherencia a las células de mamífero en cultivo, a eritrocitos y leucocitos de humanos, y a la mucosa colónica de los mamíferos, incluso la del hombre (Petri y Ravdin 1987, Ravdin y Guerrant 1981, Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1988b, Ravdin 1989a, Ravdin et al. 1989b). Esta lectina de 260 Kd (Ravdin 1989a), -- está conformada por dos subunidades (obtenidas en condiciones reductoras); una mayor de 170 Kd, responsable de la adherencia y otra menor de 35 Kd (Gitler y Mirelman 1986, Petri y Ravdin 1987, Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1988b, Ravdin 1989a, Ravdin et al. 1989b). La lectina Gal/GalNac participa de manera directa en la citólisis y muerte celular de las células blanco -- (Ravdin y Guerrant 1981, Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1988b, -- Ravdin 1989a, Ravdin 1989b, Gitler y Mirelman 1986, Petri y -- Ravdin 1987, Salata et al. 1987). La cantidad de esta lectina presente en la amiba correlaciona con la virulencia y proporcióna el siguiente orden para cepas de E. histolytica: HMI: -- IMSS 303:NIH 200:NIH Laredo (Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1989b, Gitler y Mirelman 1986). Tres clones mutantes de HMI -- IMSS deficientes en virulencia, presentaron una disminución --

en las actividades mitogénica y de lectina, ambas promovidas por la lectina Gal/GalNac (Radvin et al. 1988a); además, la habilidad del monosacárido GalNac para inhibir la adherencia amibiana sólo ha sido observada para cepas virulentas (Gitler y Mirelman 1986, Petri y Ravdin 1987).

Otra lectina amibiana, se inhibe con oligosacáridos de N-acetil-glucosamina (lectina GlcNac), como quitina, y media parcialmente la adherencia a eritrocitos, células MDCK, y células epiteliales humanas del intestino en cultivo Henle 407 (Orozco et al. 1982b-c, Gitler y Mirelman 1986, Petri y Ravdin 1987, Ravdin et al. 1988a). Sin embargo, esta lectina no parece desempeñar un papel esencial en el proceso de invasión ya que, en primer lugar, su actividad óptima es a pH 5.7 y no presenta actividad a pH fisiológico de 7.2, a diferencia de la lectina Gal/GalNac cuyo pH óptimo es 7.2 (Gitler y Mirelman 1986, Petri y Ravdin 1987, Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1989b). En segundo lugar, no hay correlación entre la virulencia amibiana y la actividad de lectina amébrica soluble (Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1989b); tampoco es esta lectina citotóxica en sí misma (Mirelman y Kobiler 1981 citado en Lushbaugh 1988b). No obstante, la lectina GlcNac podría estar implicada en la agresión y formación de quitina durante el proceso de enquistamiento amibiano (Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1989a). Una lectina superficial de 220 Kd con características parecidas a las mencionadas ha sido purificada de trofozoitos amibianos (Rosales-Encina et al. 1987, Meza et al. 1987, Ravdin 1989a).

Otras lectinas adicionales podrían participar también en el proceso de invasión amibiana; como es el caso de una lectina de 112 Kd que, al igual que la lectina Gal/GalNac, correlaciona con la virulencia (Vargas et al. 1990), y se halla involucrada parcialmente en procesos de adherencia, citólisis y fagocitosis (Arroyo y Orozco 1987).

La adherencia amibiana también depende de la función de los microfilamentos amibianos (Ravdin y Guerrant 1981, 1988b, Petri y Ravdin 1987, Long-Krug y Ravdin 1988b). Los trofozoitos forman una banda ectoplásmica de material fibroganular, posiblemente actina, en el sitio de pegado (Martínez-Palomo -- 1982). Las citocalasinas B y D, inhiben la adherencia de E. histolytica a 37°C, lo que indica la necesidad de una función de los microfilamentos intacta (Ravdin y Guerrant 1981, Ravdin 1988b). Además, el bloqueador de canales de calcio bepridil y el inhibidor del flujo intracelular de calcio, TMB-8, también inhiben la adherencia amibiana a 37°C, probablemente al evitar el flujo transmembranal e intracelular necesario para la función de los microfilamentos (Petri y Ravdin 1987, Long-Krug y Ravdin 1988b, Ravdin 1989a).

II. Citólisis y Muerte Celular

Los trofozoitos de E. histolytica lisan y matan células blanco (McCaul et al. 1977, Ravdin et al. 1980) después de establecerse un contacto firme con éstas (Ravdin et al. 1980, -- Martínez-Palomo 1982, Martínez-Palomo et al. 1989). La capacidad citolítica de la amiba se requiere para el inicio de la invasión a través de la mucosa intestinal (Martínez-Palomo 1982, Martínez-Palomo et al. 1989), y durante la diseminación metastásica (Ravdin 1988b); la lisis de neutrófilos durante la formación temprana de abscesos hepáticos parece producir efectos dañinos sobre los hepatocitos vecinos; además, la liberación de ciertos constituyentes tóxicos no-oxidativos del neutrófilo podría incrementar el potencial destructivo del parásito (Ravdin et al. 1989a). Los queladores de cationes divalentes EDTA y EGTA, ambos bloqueadores de canales de calcio bepridil y verapamil, el inhibidor de flujo intracelular de calcio TMB-8, -- así como los inhibidores de la función de los microfilamentos, citocalasinas A, B y D, inhiben la citólisis y la muerte celular causada por E. histolytica (Ravdin et al. 1980, Ravdin --

1988b Petri y Ravdin 1987, Long-Krug y Ravdin 1988b). La citólisis se inhibe a temperaturas de 25°C ó menos (Ravdin y Gue- -rrant 1981), a las cuales se inhibe asimismo la gelación de la actina (Ravdin 1988b). La exocitosis vesicular, al igual que la citólisis, se impide con los antagonistas de calcio TMB-8 y bepridil, y con citocalasina D (Petri y Ravdin 1987). Los siguientes factores: la elevación del pH intravesicular (Petri y Ravdin 1987, Ravdin 1989a), los antagonistas de la fosfolipasa A (Petri y Ravdin 1987, Lon-Krug y Ravdin 1988a, Ravdin 1989a) los monosacáridos Gal y GalNac, las glucoproteínas y los anticuerpos específicos para la lectina Gal/GalNac (Ravdin y Gue- -rrant 1981, Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1988b, 1989a, Ravdin - et al. 1989b, Gitler y Mirelman 1986, Petri y Ravdin 1987, Sa- -lata et al. 1987), reducen también la actividad citolítica y - la muerte celular causada por amibas. Todas estas observacio- -nes se traducen en los requisitos necesarios para la citólisis y la muerte celular ejercida in vitro por E. histolytica:

- 1) Viabilidad amibiana
- 2) Contacto directo entre amiba y célula blanco
- 3) Lectina Gal/GalNac
- 4) Función de los microfilamentos
- 5) Iones de Ca⁺⁺ extracelulares
- 6) Iones de Ca⁺⁺ intracelulares
- 7) pH intravesicular ácido
- 8) Fosfolipasa A
- 9) Exocitosis
- 10) Temperatura de 37°C

III. Fagocitosis

La fagocitosis es la forma principal de la adquisición de nutrientes de la amiba en su habitat natural (Gitler y Mirel- -man 1986, Mogyoros et al. 1989). Además, la frecuencia de la fagocitosis amibiana correlaciona con la virulencia (Trissl et

al. 1978, Orozco et al. 1982a, Rodríguez y Orozco 1986, Gitler y Mirelman 1986, Petri y Ravdin 1987, Orozco et al. 1988, Ravdin 1989a, Vargas et al. 1990), y como en el caso de la citólisis, se requiere para el inicio de la invasión del epitelio intestinal (Martínez 1982, Martínez-Palomo et al. 1989), y para la citopatogenicidad in vivo e in vitro, medida por la producción de abscesos y la destrucción de monocapas celulares respectivamente (Orozco et al. 1982a, 1988, Rodríguez y Orozco -- 1986). Hasta ahora se ha convenido que la fagocitosis celular de la amiba está mediada por un sistema de receptores específicos (Orozco et al. 1982b-c, Petri y Ravdin 1987, Chadee et al. 1988); pero aunque las lectinas GlcNac y la de 112 Kd intervienen parcialmente en la adherencia amibiana y la eritrofagocitosis (Orozco et al. 1982b-c, Rosales-Encina et al. 1987, Meza et al. 1987, Arroyo y Orozco 1987, Ravdin et al. 1988a), los receptores principales de la fagocitosis amibiana no han sido aún determinados (Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1988b, Orozco et al. 1988). La temperatura óptima para la citólisis y fagocitosis es de 37°C y ambos cesan a 4°C (Ravdin y Guerrant 1981, -- Orozco et al. 1988), lo que correlaciona con la necesidad de la función de los microfilamentos para los dos procesos celulares. Más aún, los trofozoitos extraídos con detergente, fijados con glutaraldehído, y teñidos con faloidina de rodamina, han revelado que los pseudópodos fagocíticos que rodean a la célula blanco contienen redes de fibras de actina (Long-Krug) y Ravdin 1988b).

IV. Proteinasas

Las proteinasas son un tipo de proteasas, es decir enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos (Lushbaugh 1988b, Mckerrow 1989); en parásitos, estas enzimas facilitan la invasión al digerir proteínas, al ayudar a evadir la respuesta inmune y al prevenir la coagulación sanguínea del huésped (Mckerrow 1989). Las proteasas se dividen en exopeptidasas o peptidasas, que hidrolizan enlaces terminales, y se nom-

bran según la especificidad del grupo que rompen; y las endopeptidasas o proteinasas, que hidrolizan a todo lo largo del péptido, y se clasifican según su mecanismo catalítico. Como se muestra en la Tabla II, las proteinasas se agrupan en cuatro tipos: serina, cisteína (tiol), carboxilo, y metaloproteinasa (Barret 1977, Lushbaugh 1988b).

En E. histolytica, el tipo de proteinasa más comúnmente encontrada es de cisteína (Tabla III); más del 80% de la actividad proteolítica de lisados amibianos pertenece a esta clase catalítica (Avila et al. 1985, Pérez Montfort et al. 1987). Las tiolproteinasa de los trofozoitos se hallan en la forma de disulfuros inactivos, los cuales se activan con la adición de agentes tiol-reductores (Gitler y Mirelman 1986). Como se aprecia en la Tabla III, las proteinasas de cisteína pueden dividirse en tres tipos distintos según su peso molecular (PM); de PM bajo (10-34 Kd), intermedio (35-55 Kd), y alto (56-75 Kd). La razón de la variabilidad observada en cada intervalo se desconoce, pero podría deberse a un polimorfismo producto de un sistema de alta mutabilidad específico para las tiolproteinasa, "estrategia" amibiana que serviría para evadir al sistema inmune del huésped. Otra razón pudiera ser la diversidad de las técnicas de purificación, lo que sugeriría que sólo existen tres tiolproteinasa amibianas o sólo una.

Algunas de las proteinasa de las otras clases catalíticas parecen ser las mismas que las de cisteína, ya que sus PM caen dentro de los mismos intervalos (Tabla III). Además, con respecto a las metaloproteinasa, se ha demostrado que las tiolproteinasa de 26 a 29 Kd (luaces y Barret 1988), 26 Kd (Otte y Werries 1989), 56 Kd (Reed et al. 1989), y de las tres categorías de PM en conjunto (Pérez-Montfort et al. 1987), presentan actividad colagenolítica. De acuerdo a esto último, de las dos actividades colagenolíticas detectadas en E. histolytica (Tabla III), la de Gadasi y Kessler fue estimulada con di-

TABLA II

Clasificación de Proteinasas

Nombre Actual	Ejemplos	Intervalo de pH para actividad
Serina	Tripsina, quimiotripsina, factores de coagulación, elastasa y catepsina G de leucocitos, quimasas, activadoras de plasminógeno	7-9
Cisteína o Tiol	Papaína, bromelaína, proteinasa de streptoco, clastripaína, catepsina B, catepsina H, catepsina L	3-8
Carboxilo	Pepsinas, renina, catepsina D	2-7
Metalo	Termolisina, colagenasas, proteinasas de microvilus.	7-9

Clasificación de las proteinasas, ejemplos e intervalos de pH para la actividad. Datos tomados de Lushabugh 1988b.

TABLA III

Clases de Proteinasas Encontradas en
E. histolytica

Enzima	Investigadores	Año(s)	Intervalos de PM
Cisteína	McLaughlin y Faubert	1977*	10-34 Kd
	Lushbaugh	1979,1981,1984,1985*	35-55 Kd
	Bos	1980*	56-75 Kd
	McGowan	1982*	
	Muñoz	1982*	
	Gadasi y Kessler	1983*	
	Scholze y Werries	1984*	
	Keene y McKerrow	1986#	
	Pérez-Montfort	1987	
	Luaces y Barret	1988	
	Ostoa-Saloma	1989a-b	
DeMeester y Mirelman	1990		
Serina	McGowan	1982*	" " "
	Pérez-Montfort	1987	
Metalo	Muñoz	1982*	
	Gadasi y Kessler	1983*	
Carboxilo	McLauhlin y Faubert	1977*	10-34 Kd
	Lushbaugh	1984*	35-55 Kd

* Lushbaugh 1988b, # Reed 1989

Las clases de proteinasas encontradas en E. histolytica, los investigadores que las detectaron, y los intervalos de pesos moleculares (PM) determinados para cada clase catalítica.

tiotreitól (DTT) e inhibida con N-etilmaleimida (NEM) (Gitler y Mirelman 1986, Lushbaugh 1988b); por lo tanto, lo más probable es que no se trate de una metaloproteinasa. En cambio Muñoz et al. detectaron actividad colagenolítica inhibible por -cisteína y no por NEM, lo que sugiere la existencia de una colagenasa como tal en E. histolytica (Lushbaugh 1988b).

En cuanto a los mecanismos de acción de las tiolproteinasas amibianas, sólo se ha determinado el correspondiente a la de bajo PM llamada histolisina de 23 a 29 Kd (Luaces y Barret 1988, Otte y Werries 1989), el cual aparece esquematizado en la Figura 1: la enzima hidroliza el lado carboxílico de cualquier aminoácido (P1) unido a un aminoácido básico (P2) del lado amino, necesario este último para la formación del complejo enzima-sustrato; el aminoácido (P1) y el que tiene unido de su lado carboxílico (P1), influyen en la susceptibilidad para la hidrólisis (Otte y Werries 1989).

Existen datos contradictorios acerca de la localización subcelular de las proteinasas amibianas. Por un lado, se ha reportado que las de PM bajo e intermedio son membranales y -- las de PM alto son solubles (Ostoa-Saloma et al. 1989a); mientras que por otro lado, se ha reportado que las proteinasas de PM bajo son citoplasmáticas, y las de PM intermedio y alto son membranales (De Meester et al. 1990). Estos datos aparentemente contradictorios sugieren que todos los tipos de proteinasas amibianas pueden ser tanto solubles como membranales; el alto recambio membranal en la amiba, que transloca proteínas intracelulares a la membrana plasmática y viceversa (Gitler y Mirelmal 1986), y/o los métodos de detección (Ostoa-Saloma et al. - 1989a, De Meester et al. 1990), son los factores probables que influyen en la obtención de uno y otro resultado. De esta manera, las proteinasas amibianas pueden actuar, indistinta- y si-nergéticamente, en la superficie membranal o pueden ser secretadas al medio externo (Becker et al. 1988).

La cantidad de tiolproteinasas por amiba, correlaciona con la virulencia de distintas cepas amibianas (Lushbaugh 1988b, - De Meester et al. 1990, Vargas et al. 1990). Sin embargo, las tiolproteinasas no son citoletales para la mayoría de los tipos celulares estudiados hasta la fecha: no causan rompimiento membranal, sólo redondean y desprenden a las células del substrato basal (Lushbaugh 1988b, Luaces y Barret 1988, Becker et al. 1988). Aunque la de bajo PM es citoletal para hepatocitos recién aislados de rata y de hamster (Pérez-Tamayo, comunicación personal). No obstante, las tiolproteinasas parecen ser las responsables de la necrosis tisular amibiana: a) son capaces de degradar substratos naturales del tejido conectivo como colágena, fibronectina, laminina y matriz extracelular (Pérez-Montfort et al. 1987, Lushbaugh 1988b, Luaces y Barret 1988, - Otte y Werries 1989, Reed et al. 1989); b) y además, se ha demostrado con un modelo experimental de amibiasis aguda, que -- las tiolproteinasas causan necrosis tisular in vivo (Becker et al. 1988). Es posible que las tiolproteinasas intervengan en los mecanismos de resistencia amibiana, como es el caso de la proteínasa de PM alto de 56 Kd (sección 1.3.V). Otra posibilidad acerca del papel de las tiolproteinasas amibianas, es que presenten funciones digestivas, regulatorias (Gitler y Mirelmal 1986, Ostoa-Saloma 1989b) y/o estructurales. Esto se ve apoyado por el hecho de que los inhibidores de tiolproteinasas incrementan la mortalidad, inhiben el crecimiento, y afectan la morfología de los trofozoitos amibianos (Becker et al. 1986, De Meester et al. 1990).

V. Resistencia Amibiana

Aparte de ser mecanismos de destrucción tisular, la adherencia, la citólisis letal, la fagocitosis de las células blanco y la acción de las proteínasas de E. histolytica son, asimismo, mecanismos de resistencia amébrica, al ejercer su acción sobre las barreras intestinales y los constituyentes del siste

ma inmune (sección 1.4):

1) El que las mucinas intestinales sean receptores altamente específicos para la lectina Gal/GalNac amibiana, facilita la invasión intestinal (Chadee et al. 1988, Ravdin 1988b, -- Martínez-Palomo et al. 1989): el fenómeno de adherencia a la mucosa, precede la penetración de los trofozoitos (Petri y Ravdin 1987, Ravdin et al. 1988a), los cuales se adhieren a las regiones interglandulares de la superficie luminal de la mucosa, donde penetran a través de movimiento pseudopodial. Una vez en la lámina propria, los parásitos se multiplican y destruyen los componentes de la mucosa por medio de citólisis de células epiteliales, fagocitosis, y liberación de enzimas potentes que degradan la matriz extracelular (Martínez-Palomo et al. 1989).

2) La citólisis y la fagocitosis de células inflamatorias polimorfonucleares (PMF), apoya y sostiene el proceso destructivo iniciado por las amibas a nivel de mucosa intestinal (Martínez-Palomo et al. 1989), y durante la formación del absceso hepático (Ravdin 1989a). Además E. histolytica es capaz de lisar neutrófilos polimorfonucleares (PMF), células mononucleares de sangre periférica (PBM), monocitos, macrófagos y linfocitos T de humanos in vitro (Salata et al. 1985, 1987). Más aún, la virulencia en E. histolytica correlaciona con su capacidad de resistir el efecto amebicida de los leucocitos (Martínez-Palomo 1982, Petri y Ravdin 1987). La lectina Gal/GalNac es altamente responsable de la resistencia amibiana, ya que la presencia de GalNac (1%) incrementa el efecto amebicida de los neutrofilos (Petri y Ravdin 1987) y de los linfocitos T8 activados con PHA (Salata et al. 1987). Todo lo anterior implica que la adherencia, citólisis letal y fagocitosis amibianas, desempeñan un papel fundamental en la resistencia del parásito al efecto de las células del sistema inmune.

E. histolytica presenta asimismo mecanismos adicionales -

para evadir las defensas del huésped:

3) La amiba posee la propiedad de redistribuir sus antígenos superficiales. Tanto lectinas como anticuerpos dirigidos contra determinantes de la superficie del trofozoito, son rápidamente agrupados en cúmulos principalmente en la región del uroide. Estos complejos ligando-receptor pueden ser desechados al medio, pero más comúnmente son fagocitados. La amiba internaliza su superficie total aproximadamente cada 20 min. De esta manera, la rápida recirculación de la membrana plasmática de la amiba, le permite evadir en gran parte el brazo humoral del sistema inmune del huésped (Martínez-Palomo 1982, Gitler y Mirelman 1986), y potencialmente, otras moléculas amebicidas como el complemento, lisozima (Sección 1.4), proteinasas y ameboporo. La lectina Gal/GalNac es un antígeno superficial de E. histolytica capaz de redistribuirse (Petri y Ravdin 1987) y la cual se encuentra en una menor concentración en cepas y tipos de amibas menos virulentas (Ravdin et al. 1988a); en consecuencia, es posible que esta lectina intervenga en el proceso de redistribución, y por tanto, las amibas de menor virulencia sean más susceptibles a la acción de las moléculas amebicidas.

4) Las amibas virulentas tienen la capacidad de resistir la acción lítica del complemento presumiblemente debido a la acción de una reductasa superficial. La polimerización del complejo lítico C9 del complemento parece requerir nucleación inicial, que incluye la abertura de disulfuros vecinales reactivos en C9, para formar dímeros unidos por puentes de disulfuro (Fig. 2A). Se cree que la reductasa amibiana impide la polimerización de C9 de dos maneras: 1) la reductasa actuaría sobre los disulfuros superficiales; posteriormente, los tioles libres reaccionarían con los disulfuros vecinales expuestos de las moléculas C9, y formarían disulfuros mixtos e inhibirían la polimerización por impedimento estérico (Fig. 2B). 2) Al--

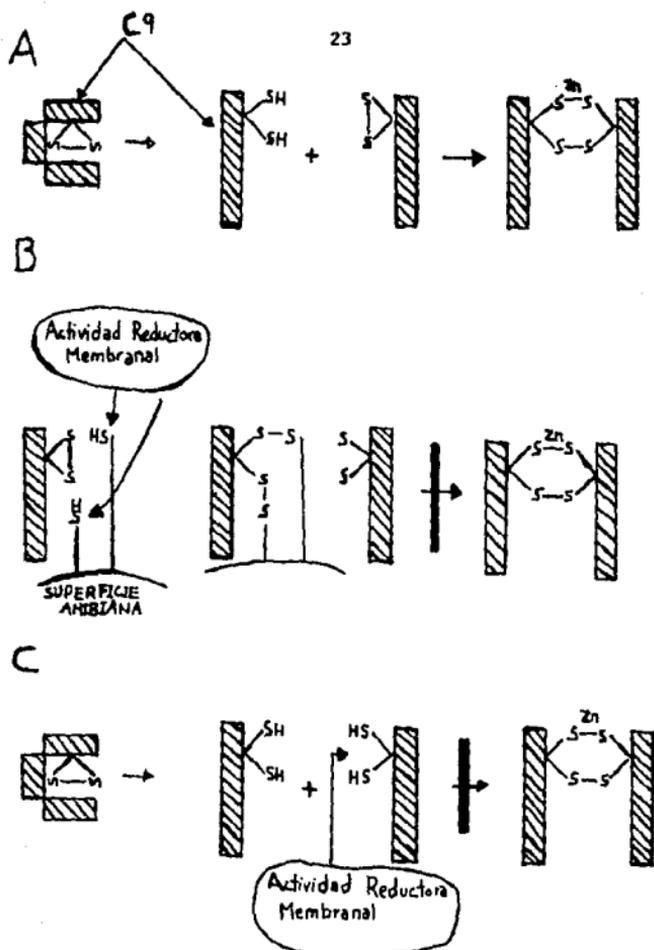


FIGURA 2

Papel de la reductasa amibiana durante la formación de dímeros de C9. (SH) tioles libres; (S-S) disulfuros vecinales; (S-S) disulfuros mixtos. (A) - formación de dímeros de C9; (B) reducción de los disulfuros superficiales por la reductasa amibiana; (C) reducción de los disulfuros vecinales de C9 por la reductasa amibiana.

ternativamente, la reductasa actuaría directamente sobre los - disulfuros vecinales reactivos de C9 lo que impediría su nu- cleación (Fig. 2C) (Mogyoros et al. 1989). Ambos mecanismos - implican un incremento en la incorporación de C9 a la membrana amibiana, el cual efectivamente ha sido observado (Mogyoros et al. 1986b, 1989). No obstante, tanto los complejos líticos mo- dificados por acción de la reductasa como los intactos, serían desechados subsecuentemente por medio de un proceso de vesicu- lación, activado probablemente por el sistema transductor de - señales que incluye la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato para liberar inositol trifosfato y diacil-glicerol - (Mogyoros et al. 1989). La acción conjunta de la reductasa y la vesiculación celular, podría ser un mecanismo eficaz para - resistir el efecto del ameboporo amibiano, y para mantener - - inactivadas a las tiolproteinasas al oxidar sus sitios activos y utilizar los hidrógenos como fuente reductora.

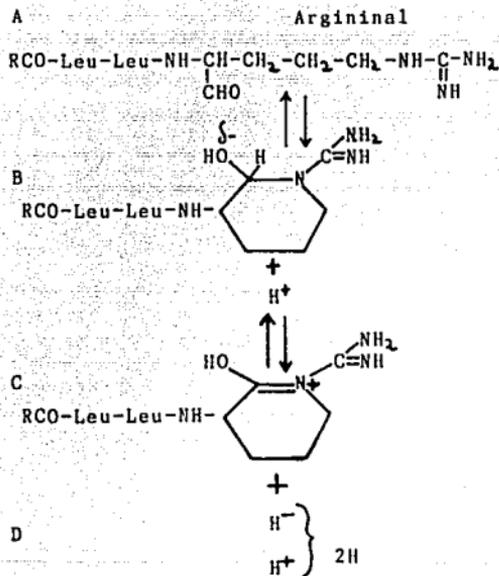
El impedimento de la formación del poro lítico C9, no se debe a la acción enzimática de una tiolproteinasas que lo degrada C9, ya que la adición de leupeptina (inhibidor de tiolproteina- sas) vuelve a las amibas resistentes al complemento, al igual que la cisteína y el ditiotreitól (Mogyoros et al. 1989). Por lo tanto, es probable que la leupeptina confiera la resisten- cia de la misma manera que la cisteína y el ditiotreitól, es - decir, al donar hidrógenos y reducir de esta manera los tioles superficiales de la amiba, lo que produce un efecto análogo al de la reductasa superficial amibiana (Mogyoros et al. 1989). - La forma isomérica anular de la leupeptina (Umezawa y Aoyagi - 1977), puede funcionar como agente reductor al sufrir una reac- ción de oxidación similar a la de los nucleótidos de piridina, que resulta en la donación de dos átomos de hidrógeno (Fig. 3). Otra alternativa es que la leupeptina estabilice o active a la reductasa superficial de la amiba.

5) E. histolytica secreta toxinas que alteran la respues-

ta inmunocelular: a) se ha visto que ciertos antígenos solubles de E. histolytica poseen propiedades mitogénicas e inductivas capaces de actuar en blancos distantes (Denis y Chadee - 1988); esto correlaciona con la actividad mitogénica de la legítima Gal/GalNac soluble para células PBM (Petri y Ravdin 1987, Ravdin et al. 1988a). b) Existen en E. histolytica productos solubles y/o membranales específicos que suprimen en macrófagos cercanos el estallido respiratorio, la secreción y expresión membranal de interleucina, el efecto amebicida y la capacidad de responder a las interleucinas, estos mismos antígenos estimulan las funciones mencionadas en macrófagos distantes -- (Denis y Chadee 1988). c) Las amibas secretan un producto -- inhibidor de la locomoción de los macrófagos con un peso molecular entre 478 y 765 daltones (Kretschmer et al. 1985). d) -- Ciertas proteínas solubles de E. histolytica inhiben neutrófilos humanos y estimulan actividades oxidativas (Ravdin 1989a). Todas estas toxinas inhiben las funciones efectoras de los leucocitos, lo que podría promover la inmunosupresión celular observada en la amibiasis activa y consecuentemente la falta de depósito de cicatriz durante la curación de las lesiones amebicas (Kretschmer et al. 1985, Gitler y Mirelman 1986, Petri y Ravdin 1987, Denis y Chadee 1988). En este sentido, la interleucina-1, suprimida en macrófagos cercanos por factores de E. histolytica, interviene en el depósito de colágena, una parte crucial del proceso de cicatrización (Denis y Chadee 1988).

6) En E. histolytica, la tiolproteínasa de 56 Kd activa el complemento de manera análoga a como lo hacen las C3 convertasas, con la diferencia de que corta a C3 un aminoácido distal con respecto a éstas. No obstante, los fragmentos C3a -- anafilatoxina y quimioattractante-- y C3b --iniciador del complejo lítico C9-- formados por acción de esta tiolproteínasa resultan perfectamente funcionales. De esta manera, la activación de complemento mediada por la proteínasa de alto PM, podría contribuir a la patogenia de la amibiasis invasiva: a) al

FIGURA 3



Oxidación hipotética de la Leupeptina en la que podría fungir como un donador de hidrógenos de manera similar a los nucleótidos de piridina. La Leupeptina (A) o propionil-(o acetil) -L-leucil-L-leucil-Argininal puede intercambiarse a una forma isomérica de Leupeptinol con un anillo piridínico (B) (Umezawa y Aoyagi - 1977). La región parcialmente electronegativa del anillo conformada por el residuo hidróxido, podría suscitar un ataque nucleofílico por parte del nitrógeno anular, al donar éste su par de electrones, un electrón al carbono asimétrico que contiene el hidróxido y el otro para formar un enlace adicional con este carbono; esto provoca a su vez que el carbono asimétrico done el electrón extra al residuo hidrógeno que se libera como ion hidruro (H^-). Por lo tanto, como resultado final, se obtiene la forma oxidada del anillo -- leupeptínico (C), y la ganancia neta de dos átomos de hidrógeno, al combinarse el ion hidruro (H^-) con un ion hidrógeno (H^+) tomado del medio (D).

atraer neutrófilos, los cuales incrementan el daño en hepatocitos y el potencial destructivo amibiano (Ravdin 1989a, sección 1.3.II); b) al provocar un desequilibrio en el C3b humoral que se incrementaría porque el C3 soluble es el susceptible a ser degradado por la amiba, lo que no ocurre para el C3 unido a su superficie (Reed et al. 1989). El exceso del C3b humoral activaría la vía alterna del complemento lo que lisaría las células del huésped, incluso las del sistema inmunológico.

7) Los sistemas detoxificadores en E. histolytica forman un mecanismo importante de resistencia, tanto contra toxinas naturales del huésped, como contra amebicidas terapéuticos. Las amibas presentan un transportador de aniones. Además, la glucoproteína-P es una proteína de transporte multidroga para cationes que ha sido hallado en algunos parásitos (Mogyoros et al. 1989).

VI. Amiboporo

El amiboporo es una proteína amibiana encontrada dentro de los trofozoitos y en su medio de crecimiento, que se incorpora espontáneamente a las membranas de las células blanco y forma poros para iones, los cuales difunden libremente según sus gradientes de concentración y despolarizan al blanco (Gitler y Mirelman 1986, Mogyoros et al. 1989). La permeabilidad al calcio aumentada podría causar la despolarización de la tubulina y la apertura de las uniones celulares, lo cual ya ha sido observado (Gitler y Mirelman 1986, Martínez-Palomo 1982). La permeabilidad iónica aumentada podría activar a las ATPasas de Na/k y Ca, y originar una caída rápida en los niveles de ATP; esto último podría ser causa de la formación excesiva de ampollas superficiales en las células blanco después de haber entrado en contacto con la amiba (Gitler y Mirelman 1986).

El amiboporo es un monómero de 14 Kd; existen dos isoform-

mas diméricas de 28 Kd con valores de pI de 6.8 y 5.3 presentes en una proporción de 7 a 1, y con una capacidad de agregación altamente cooperativa. Normalmente el amiboporo se comporta como un agregado supramolecular junto con otras proteínas de función desconocida, y con una apertura potencial de unos 40 canales (Gitler y Mirelman 1986, Rosenberg et al. 1989). El agregado no se encuentra rodeado por membrana dentro de la célula, por lo que se cree que al interactuar con la superficie endofacial de la membrana plasmática genera un flujo de calcio hacia dentro de la amiba, que resulta en la vesiculación celular y liberación del agregado (Mogyoros et al. 1989).

Sin embargo, a pesar de los estudios arriba mencionados, el papel del amiboporo en la citólisis y muerte celular mediada por contacto no ha sido demostrado directamente (por medio de anticuerpos dirigidos contra el amiboporo que inhiban también la citólisis) (Rosenberg et al. 1988). Más aún, los macrófagos y linfocitos son capaces de repolarizarse en unos 60 min., lo que contrarresta el efecto del amiboporo. Esto indica que otros factores amibianos deben entrar en juego para poder lisar o matar a las células blanco (Gitler y Mirelman 1986, Mogyoros et al. 1989).

VII. Fosfolipasas

Se han purificado dos tipos de fosfolipasas A de E. histolytica: una independiente de calcio que opera al máximo a pH ácido de 4.5 y otra, asociada a la membrana plasmática, dependiente de calcio y con un pH óptimo de 7.5 (Petri y Ravdin - - 1987, Long-Krug y Ravdin 1988a). Estas fosfolipasas podrían contribuir a la lisis celular por medio de la producción de lisofosfolípidos que poseen efectos de detergente sobre las membranas celulares (Petri y Ravdin 1987, Long-Krug y Ravdin - - 1988a), o por medio de acción directa sobre las membranas de las células blanco (Lushbaugh 1988b, Long-Krug y Ravdin 1988a).

No obstante, al igual que el amiboporo, el papel de las fosfolipasas en la citólisis no ha sido demostrado directamente (Petri y Ravdin 1987). Más aún, existen datos controversiales -- que se postulan en contra de las fosfolipasas amibianas como mecanismo citolítico letal directo: 1) las fosfolipasas son capaces de atacar una membrana plasmática únicamente en presencia de agentes que dañan membranas como medio hipotónico, detergentes, y péptido de veneno de víbora (DLF) (McCaul et al. 1977). 2) la fosfolipasa calcio-dependiente, la cual postulan como la efectora del mecanismo citolítico directo, presenta un segundo pico máximo de actividad mucho mayor a pH 4.5 (58 nmoles/hr/mg) que el de pH 7.5 (9 nmoles/hr/mg); el primero es -- comparable con el de la fosfolipasa independiente de calcio -- (66 nmoles/hr/mg) (Long-Krug y Ravdin 1988a). 3) La citólisis amibiana requiere de un pH ácido (Petri y Ravdin 1987, Ravdin 1989a). 4) La quinacrina, inhibidor de fosfolipasa A, puede aumentar el pH lisosomal (Long-Krug y Ravdin 1988a) y de esta manera inhibir la acción citolítica de la amiba (Long-Krug y Ravdin 1988a). Estos hechos sugieren que la fosfolipasa A amibiana cumple principalmente con una función degradativa lisosomal efectuada a pH ácido, más que con una función citolítica letal directa mediada a pH fisiológico de 7 a 7.5.

VIII. Conclusiones de la Sección 1.3

Lo expuesto en esta sección indica que la fagocitosis y la citólisis en E. histolytica, mediadas por la adherencia previa a las células blanco, son mecanismos citoletales en los -- que las toxinas amibianas (proteasas, ameboporo, fosfolipasas, lectinas etc.) no intervienen de manera importante para la mayoría de los sistemas amiba-célula blanco utilizando hasta la fecha (McCaul et al. 1977, Ravdin et al. 1980, Ravdin 1988b, Lushbaugh 1988b, Luaces y Barret 1988, Becker et al. 1988), -- aunque probablemente sí ejercen en gran parte el efecto citotóxico no letal y de destrucción de tejido (Lushbaugh 1988b, Be-

cker et al. 1988, Long-Krug y Ravdin 1988a, Ravdin 1988b, Mo--gyoros et al. 1989). Además, se ha observado de manera inde--pendiente para los sistemas célula hepática Chang-amiba, célula CHO-amiba y célula BHK-amiba, que ninguna toxina amibiana -membranal o soluble (en homogenados y sobrenadantes respectiva--mente) es responsable por sí misma del efecto citolítico letal (McCaul et al. 1977, Ravdin et al. 1980, Mattern 1980, citado en Lushbaugh 1988b). Esto es posible si se piensa en la difi--cultad y gasto energético que implicaría a la amiba tener un -mecanismo eficiente para poder resistir la autólisis mediada -por sus propias toxinas, el cual tendría que existir en este -caso, ya que la amiba sólo lisa las células blanco (lo que se llama muerte unidireccional, según Petri y Ravdin 1987). En -términos evolutivos, un mecanismo de resistencia a la autólisis podría conformar con el tiempo una desventaja selectiva. -Cualquier teoría que intente definir el mecanismo de la citólisis letal amibiana, debe explicar satisfactoriamente las si--guientes consideraciones:

- a) La unidireccionalidad de E. histolytica (Petri y Rav--din 1987).
- b) El efecto de "pegar y correr" ("hit and run damage") -observado (Petri y Ravdin 1987).
- c) La velocidad extrema del "golpe mortal" amibiano reci--bido por la célula blanco, tan sólo segundos o minutos después del contacto mediado por la lectina Gal/GalNac (Ravdin et al. 1980, Ravdin 1989a, Martínez-Palomo - -1982, Petri y Ravdin 1987). Además el recambio membra--nal amibiano elevado (Gitler y Mirelman 1986) ocasiona que una citotoxina membranaral hipotética se movilice --continuamente con extrema rapidez, lo que evita que --permanezca tiempos prolongados en el mismo sitio de ac--ción.
- d) Los efectos resultantes en las células blanco pareci--

dos a los de un cambio osmótico, luego de establecerse el contacto con la amiba, como por ejemplo: redondeamiento (McCaul et al. 1977), vesiculación (Ravdin et al. 1980, Martínez-Palomo 1982, Gitler y Mirelman 1986), disociación de microtubulos periféricos (McCaul et al. 1977), y ensanchamiento de los espacios intercelulares debido a la apertura de las uniones celulares impermeables (Martínez-Palomo 1982).

- e) La razón por la que la citólisis amibiana es independiente de la motilidad de los trofozoitos (Ravdin et al. 1980, Petri y Ravdin 1987).
- f) La razón por la que fagocitosis amibiana es independiente de la citólisis y ocurre después de ésta (Ravdin et al. 1980) o en su ausencia (Ravdin y Guerrant - 1981).

Hasta ahora no ha sido descrito algún tipo de toxina citoletal en E. histolytica que explique de manera satisfactoria todos los puntos mencionados.

Finalmente, de los diez requisitos del efecto citolítico letal amibiano mencionados anteriormente, el 5 ó los iones extracelulares de calcio parecen ser necesarios para una adhesión efectiva mediada por la lectina Gal/GalNac (Ravdin et al. 1988a) y para desestabilizar los mecanismos homeostáticos de la célula blanco (Long-Krug y Ravdin 1988b, Gitler y Mirelman 1986). El 6 ó el flujo intracelular de calcio, en analogía con los procesos citolíticos calcio-dependientes en otros fagocitos eucariotes, puede ser necesario para la secreción de sustancias tóxicas; para cambios en el citoesqueleto requeridos para movilidad y actividades citolíticas (quimiotaxis, exocitosis, fagocitosis, movilización de receptores superficiales); o para activar a las enzimas dependientes del calcio, como las -

que intervienen en el metabolismo de lípidos o en el transporte iónico (Long-Krug y Ravdin 1988b). El 7 ó el mantenimiento de un pH intravesicular ácido, el 8 ó la actividad de la fosfolipasa A óptima a pH ácido y el 9 ó la exocitosis, correlacionan con la necesidad de mantener un potencial degradativo elevado y continuo debido al alto nivel de fagocitosis y recambio membranal de la amiba. Asimismo, el pH ácido se requiere para la disociación máxima de complejos ligando-receptor lo que permite reciclar y mantener un número adecuado de receptores superficiales. El 10 ó la temperatura de 37°C es necesario para el funcionamiento general óptimo de E. histolytica, ya que es un parásito de mamíferos.

Todos los factores arriba mencionados se requieren para que la amiba ejerza su capacidad citolítica, pero no intervienen directamente en el daño a la membrana del blanco mediado por contacto celular. En consecuencia, debe existir un mecanismo de citólisis letal mediado por contacto que dependa directamente de los cuatro requerimientos que no pueden ser eliminados de estos diez: 1) viabilidad: amibas enteras y vivas (McCaul et al. 1977, Ravdin et al. 1980), 2) contacto directo entre amiba y célula blanco (Ravdin et al. 1980, Martínez-Palomo 1982), 3) receptores específicos: lectina Gal/GalNac (Ravdin y Guerrant 1981, Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1988b, 1989a, Ravdin et al. 1989b, Salata et al. 1985, 1987, Gitler y Mirelman 1986, Petri y Ravdin 1987), 4) activación del citoesqueleto: función microfilamentosa amibiana (Ravdin y Guerrant 1981, Ravdin 1988b, Petri y Ravdin 1987, Long-Krug y Ravdin 1988b). Dicho mecanismo aún no ha sido descrito.

1.4 Mecanismos de Defensa del Huésped

I. Mecanismos No Inmunes

Existen barreras contra la infección de parásitos entéri-

cos como: el pH ácido del estómago, las enzimas digestivas y - la capa de mucosa intestinal. Las mucinas colónicas, al actuar como receptores de alta afinidad para la lectina Gal/Gal-Nac de la amiba ($8.2 \times 10^{-11} \text{ M}^{-1}$), atrapan a los trofozoitos y les impiden adherirse, lisar y fagocitar células epiteliales, por lo que fungen como uno de los mecanismos principales de defensa contra la invasión de tejido. La capa muscularis mucosa actúa como una barrera parcial al evitar el progreso de la invasión a capas más profundas de la pared intestinal (Chadee et al. 1988, Ravdin 1989a, Martínez-Palomo et al. 1989).

II. Respuesta Inmunoceular

Se ha observado actividad efectora inmunoceular contra - E. histolytica tanto en animales como en humanos. La respuesta inflamatoria no específica constituye la primera barrera -- contra la infección extraintestinal (Gold 1989). Estudios tan to in vivo como in vitro han demostrado que E. histolytica provee una señal quimioattractante para neutrófilos polimorfonu- cleares de humanos (Ravdin 1989a). Los neutrófilos tienen la capacidad de matar amibas: a) en una relación de 1000 neutrófi los/amiba, cepa 303-NIH (no virulenta), en 22 hr a 37°C; b) en presencia de GalNac (1%), en una relación de 200 neutrófilos/ amiba, cepa HM1, en 3 hr a 37°C (Petri y Ravdin 1987).

Los macrófagos son en gran medida los responsables de la resistencia del huésped contra el desarrollo de abscesos hepáticos invasivos y la diseminación metastásica amibiana (Salata et al. 1985, 1987). Los macrófagos de pacientes tratados por abscesos hepáticos amibianos, pueden ser activados con linfocinas inducidas con Con A y matar amibas (Salata et al. 1985). - Asimismo, los macrófagos obtenidos de individuos no inmunes -- pueden ser activados con linfocinas y presentar funciones amebicidas; estos macrófagos matan trofozoitos a través de un mecanismo contacto-dependiente y anticuerpo-independiente, que

incluye procesos tanto dependientes como independientes de oxígeno (Salata et al. 1985).

Las proteínas solubles de E. histolytica pueden inducir, en linfocitos de pacientes curados de abscesos hepáticos (Ravdin 1989a) y linfocitos no inmunes (Salata et al. 1985), linfocinas capaces de activar macrófagos de individuos no infectados para matar amibas virulentas; además, los linfocitos no inmunes producen estas linfocinas activadoras si se estimulan con PHA y Con A (Salata et al. 1985). Los linfocitos T inmunes de pacientes curados de abscesos hepáticos amibianos (Salata et al. 1987, Castellanos et al. 1989), o estimulados por 3 a 5 días con antígeno total de E. histolytica (Ravdin 1989a, Petri y Ravdin 1987, Castellanos et al. 1989), son citotóxicos para los trofozoitos amibianos, lo que indica la activación antígeno-específica de la función citotóxica de los linfocitos T en la amibiasis invasiva. Sin embargo, la acción citotóxica no es sólo antígeno-específica, ya que los linfocitos T8 no inmunes y activados de 18 a 24 hr con PHA (Salata et al. 1987), matan trofozoitos virulentos a través de un mecanismo de contacto dependiente y antígeno-independiente. Además, aún sin un contacto directo, los linfocitos pueden inhibir la síntesis de proteínas y DNA de la amiba por medio de la secreción de interferón gama (Castellanos et al. 1989).

En general, los leucocitos obtenidos de animales inmunizados son capaces de matar trofozoitos amibianos de una manera significativamente mayor que los leucocitos obtenidos de animales no inmunizados (Petri y Ravdin 1987).

Todas las observaciones arriba mencionadas sugieren que la respuesta inmunocelular, sobre todo a largo plazo, es uno de los principales mecanismos de defensa del huésped contra la infección de E. histolytica que actúa de manera antígeno-dependiente e independiente (Salata et al. 1985, 1987, Castellanos

et al. 1989, Ravdin 1989a); no obstante, no explica las susceptibilidades diferenciales a la infección amibiana en modelos experimentales (Gold 1989), por lo que otros mecanismos de defensa deben de estar también implicados de manera importante en la amibiiasis invasiva.

III. Respuesta Humoral

Una o dos semanas después de iniciados los síntomas, los pacientes de amibiiasis invasiva desarrollan títulos altos de anticuerpos contra la amiba que reconocen la subunidad de 170 Kd de la lectina Gal/GalNac y otras glucoproteínas de 37, 59, 90 y 110 Kd (Ravdin 1989a). Aunque el desarrollo de una respuesta humoral no resulta en la remisión espontánea de una colitis amibiana establecida o de abscesos hepáticos, la producción de anticuerpos secretorios dirigidos contra las lectinas podría contribuir a la resistencia a infecciones invasivas subsecuentes o a la colonización intestinal (Ravdin 1989a). Asimismo, la producción de anticuerpos específicos o inespecíficos contra determinantes superficiales de la amiba podría activar la vía clásica del complemento y promover de esta manera la eliminación de la infección invasiva (Calderón 1988).

Hasta donde sabemos, existe un artículo que sugiere que los individuos curados de amibiiasis invasiva son relativamente inmunes a la recurrencia de la infección invasiva. Los animales experimentales curados de la enfermedad invasiva, o inmunizados con proteína total o lectina Gal/GalNac del parásito, adquieren inmunidad a exposiciones intestinales e intrahepáticas de los trofozoitos de E. histolytica. Estos datos, más los mencionados anteriormente, sugieren que posiblemente se desarrolla una inmunidad protectora ejercida a corto y a largo plazo contra la infección invasiva mediada por ambos brazos del sistema inmune; además, apoyan la factibilidad del desarrollo

de una vacuna efectiva contra la amibiasis y la colonización intestinal (Ravdin 1989a, Petri y Ravdin 1991). No obstante, la elevada frecuencia de reinfección e invasión a pesar de los títulos altos de anticuerpos, así como el incremento con la edad de la morbilidad y mortalidad por la infección de E. histolytica (Martínez-Palomo 1986), son argumentos en contra de la adquisición de inmunidad protectora y, por ende, en contra de la producción de una vacuna efectiva.

IV. Complemento y Lisozima

El suero puede inducir la lisis de trofozoitos amibianos por medio de por lo menos dos mecanismos: 1) los experimentos en sistemas in vitro e in vivo, indican que el complemento desempeña un papel importante como defensa natural contra la amibiasis extraintestinal. E. histolytica activa ambas vías del complemento, la clásica y la alterna, con una mayor participación de la clásica en ausencia de anticuerpos (Calderón 1988). La vía clásica se activa por complejos inmunes, superficies de patógenos y algunas moléculas solubles; en la vía alterna, -- los productos activadores generalmente proveen un medio protector para la participación de C3b que evitan su inactivación -- proteolítica por el factor I (Calderón 1988).

2) La lisozima es una enzima termoestable presente a bajos niveles en el suero, la cual actúa sinérgicamente con el complemento en la lisis de microorganismos. En concordancia con lo anterior, el suero mata amibas a través de una reacción dependiente de lisozima, la cual actúa en conjunto con la vía alternativa del complemento (Mogyoros et al. 1986a). Es interesante que en estos experimentos, aunque parecidos a los mencionados arriba (Calderón 1988), no se observa la participación de la vía clásica del complemento; sin embargo, hay cambios en las condiciones experimentales que, no obstante pequeños, podrían contribuir a la obtención de resultados diferen-

tes: a) condición diferencial de suero en distintos individuos; b) incubación a 36°C (Calderón 1988) o a 37°C (Mogyoros et al. 1986a); c) incubación por 35 min (Calderón 1988) ó 40 min -- (Mogyoros et al. 1986a).

Se desconoce la naturaleza del sustrato amibiano digerido por la lisozima; pero existen por lo menos dos posibilidades: 1) La lisozima muestra actividad de quitinasa. Las paredes de los quistes amibianos están compuestas de polímeros parecidos a quitina, por lo que los polímeros unidos por enlaces lineares B-(1-4) de GlcNac, son susceptibles a la acción de la lisozima, y podrían estar presentes en diferentes estadios del ciclo celular (Mogyoros et al. 1986a). 2) La segunda posibilidad es mucho más interesante: la leupeptina, cisteína y ditiotretitol inhiben la acción amebicida conjunta del complemento y la lisozima (Mogyoros et al. 1986a, Mogyoros et al. 1989). Como se vió en la sección 1.3.V, esto lo hacen al simular la actividad de la reductasa amibiana al reducir los tioles superficiales y causar un aumento transitorio en la incorporación de complemento a la membrana para luego ser desechado (Mogyoros et al. 1989). Sin embargo, en ausencia de lisozima disminuye la incorporación de complemento y la lisis amibiana (Mogyoros et al. 1986a)). Esto sugiere que la lisozima degrada la reductasa superficial de la amiba, y en su presencia, por ende, se desecha menos complejo C9 lítico; lo anterior también explicaría porque la leupeptina, cisteína y ditiotretitol inhiben ambas vías amebicidas simultáneamente: la acción de la lisozima en el suero permitiría el complemento actuar más eficientemente, al degradar a la reductasa superficial que lo inhibe. Al agregar algún donador de hidrógeno al medio, se genera una vía alterna para reducir los tioles superficiales, por lo que se inhibe la acción del complemento, y por ende, la de la lisozima, indistintamente de que se degrade la reductasa. La lisis parcial de los trofozoitos medida por lisozima en ausencia de suero y complemento (Mogyoros et al. 1986a) podría deberse, en

tonces, a una desestabilización membranal causada por la degradación de la reductasa, la rigidez de los disulfuros superficiales-oxidados en ausencia de reductasa y la falta de proteínas del suero que protejan a la amiba contra la lisis osmótica (Mogyoros et al. 1986a). Y es quizás, por ser una lisis únicamente desestabilizadora, que la lisozima no pueda lisar totalmente a las amibas en ausencia de suero (Mogyoros et al. 1986a).

1.5 Virulencia de E. histolytica

I. Virulencia, Patogenicidad y Medición

Se ha definido el término patogenicidad como la capacidad de un organismo para producir enfermedad; mientras que la virulencia se refiere al grado de enfermedad que presenta un paciente (Martínez-Palomo 1982, Ravdin 1988b).

Alternativamente, se ha referido a la virulencia como la capacidad del parásito de invadir y resistir condiciones adversas, y a la patogenicidad, como la susceptibilidad del huésped a ser infectado y padecer síntomas (Lushbaugh 1988b, Mogyoros et al. 1989), lo que considera un marco genético (Mogyoros et al. 1989) y un estado nutricional del huésped (Ravdin 1988b). Esta segunda acepción es la que se consideró durante este trabajo por dos razones: 1) la capacidad de las amibas para producir enfermedad no es general: Walker y Sellards en 1913 establecieron que el mismo tipo de amiba puede ser patógena en algunos individuos y no serlo en otros (Kean 1988). Por lo tanto, si un parásito es hasta cierto grado capaz de invadir y resistir condiciones adversas (virulencia), la inducción de esta capacidad, y la producción y nivel de enfermedad (patogenicidad) dependen de la susceptibilidad del huésped. 2) Con la segunda acepción, la resistencia parasitaria se transforma en un mecanismo de agresión.

Existen varios métodos para distinguir amibas virulentas de las no virulentas, e incluyen zimodemos o patrones isoenzimáticos (Gitler y Mirelman 1986, Walsh 1988), antígenos específicos, habilidad para matar células, aglutinación con concanavalina A (Walsh 1988), eritrofagocitosis (Orozco et al. 1988), actividad de enzimas proteolíticas y colagenasa, y resistencia al complemento (Gitler y Mirelman 1986). Sin embargo, la medida estándar de virulencia en diferentes cepas de amibas ha sido la formación de abscesos hepáticos en hamsters (Gitler y Mirelman 1986, Ravdin 1988b).

II. Factores de la Virulencia

Como se discutió en la sección 1.3, los mecanismos de adherencia, citólisis, fagocitosis, tiolproteinasas y resistencia al complemento correlacionan con la virulencia amibiana. La adherencia (Orozco et al. 1982b, Rodríguez y Orozco 1986), la producción de las tiolproteinasas (Rodríguez y Orozco 1986, Lushbaugh 1988b), la fagocitosis (sección 4.2.IV), no son, por sí solos, factores suficientes para la expresión de la virulencia in vivo. Además, el que la amiba presente un zimodemo virulento no garantiza que presente resistencia al complemento (Gitler y Mirelman 1986). Por lo tanto, parece ser que la acción conjunta de todos los mecanismos de virulencia es necesaria para expresar un fenotipo agresivo en el huésped.

Estos mecanismos dependen de procesos moleculares independientes como expresión de adhesinas, función microfilamentosa (Ravdin et al. 1980, Ravdin y Guerrant 1981, Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1988b, 1989a, Ravdin et al. 1989b, Orozco et al. 1982b y c, 1988, Petri y Ravdin 1987), mantenimiento de un pH ácido (Petri y Ravdin 1987, Ravdin 1989a) y recambio membranar: endocitosis y exocitosis (Gitler y Mirelman 1986, Petri y Ravdin 1987).

III. Adquisición de la Virulencia

Cuando las amibas con zimodemo no-patogénico crecidas en un medio xénico (con flora bacteriana) se axenizan, se observa un incremento gradual en la virulencia, hasta que a los 37-40 días el zimodemo se vuelve patogénico. Si estas amibas se reasocian con la flora bacteriana, a los 7 días se revierte el zimodemo a no patogénico (Gitler y Mirelman 1986).

E. histolytica crecida axénicamente tiene la capacidad de desarrollar resistencia al complemento si ahora se crece: a) - en presencia de complemento activado (Mogyoros et al. 1986b, - 1989, Calderón 1988); b) en presencia de suero inmune inactivado por calor (Mogyoros et al. 1989); c) en presencia de colesterol (Gitler y Mirelman 1986); d) en el hígado del huésped -- (Mogyoros et al. 1986b, 1989, Gitler y Mirelman 1986); y e) en presencia de flora bacteriana (Gitler y Mirelman 1986, Mogyoros et al. 1989). Todas estas condiciones conducen a un incremento de la virulencia medida in vivo (Mogyoros et al. 1986b, 1989, Gitler y Mirelman 1986), e in vitro (Calderón 1988). -- Las amibas crecidas en presencia de flora bacteriana pierden - la resistencia al complemento si se les adapta a crecer nuevamente en medio axénico (Mogyoros et al. 1986b, 1989).

La conversión a un zimodemo patogénico por axenización -- (Gitler y Mirelman 1986) y la resistencia al complemento (Mogyoros et al. 1986b, Calderón 1988), se han obtenido a partir de clonas de E. histolytica, lo que aunado a la baja tasa de mutación de la amiba (Rodríguez y Orozco 1986, Mogyoros et al. 1986b), indica que los anteriores son caracteres adquiridos -- por medio de una inducción específica, y no producto de un proceso de selección de una clona poblacional determinada o producto de una serie de mutaciones fortuitas.

Lo anterior indica que en efecto, E. histolytica es capaz

de adquirir virulencia. Ahora bien, en general se acepta que el fenotipo virulento de un organismo se expresa cuando las -- condiciones le son adversas (Mogyoros et al. 1989); pero ¿qué quiere decir que "las condiciones le son adversas"?

Paradójicamente, las observaciones anteriores indican que los trofozoitos amibianos adquieren virulencia por medio de -- procesos inversos: axenización y xenización. En consecuencia, no es el nivel del carácter cambiante --o grado de adversidad-- sino el cambio mismo, merced al cual la amiba adquiere virulencia. La virulencia se revierte si las amibas se crecen nuevamente en las condiciones originales. Una observación adicional es que el nivel de virulencia de una población amibiana -- puede disminuir con la prolongación del cultivo (Pérez-Tamayo, comunicación personal, y Mattern et al. 1982). Esto quiere decir que si las condiciones se estabilizan --equivalente a la -- prolongación del cultivo-- o retornan las condiciones homeostáticas originales (arriba), las amibas se readaptan perdiendo o paliando su virulencia. En esta sección se discutió que E. -- histolytica es capaz de volverse virulenta debido a un cambio en los niveles de flora bacteriana. Otros caracteres específicos propiciadores de la virulencia podrían ser la producción -- de IgA intestinal, la dieta alimenticia, factores intestinales, etc.

En resumen, la virulencia de un organismo dado parece ser un programa genético inherente a éste que le permite sobrevivir en condiciones adversas y se enciende o se apaga en respuesta a cambios específicos del medio circundante, independientemente del sentido hacia más o menos adversidad; el restablecimiento de la homeostasis permite la remisión de la virulencia. En este contexto, es posible que el trofozoito recién emergido del quiste sea inicialmente virulento debido al cambio que representa ahora el medio; si las condiciones se estabilizan la virulencia desaparece (esto no implica la remisión

de la amibiasis luminal). Empero si se pierde la homeostasis de algún carácter específico para la virulencia en el intestino, las amibas se vuelven virulentas y pasan de comensales a -invasivas, lo que puede o no producir amibiasis invasiva según el marco genético (Mogyoros et al. 1989) y el estado nutricional (Ravdin 1988b) del mismo huésped. La etapa invasiva extra-intestinal implicaría un desequilibrio continuo debido a la exposición constante a condiciones cambiantes y sistemas defensivos que imperan dentro del huésped. Si este último es capaz de resistir la etapa invasiva y recuperar la homeostasis intestinal, se eliminaría la enfermedad. De esta manera, la inducción de la virulencia amibiana, al igual que la patogenicidad, depende directamente de la susceptibilidad temporal o permanente (marco genético) del huésped.

IV. Mecanismo Inductor de la Virulencia Amibiana

A pesar de que se desconoce cuál es el mecanismo inductor de la virulencia amibiana, existen dos posibilidades en cuanto a su naturaleza:

a) Inducción por medio de uno o más sistemas reguladores transductores de señales, sensibles a estímulos internos y/o -externos- hay varias pruebas que apoyan la existencia del sistema que utiliza calcio como segundo mensajero (Long-Krug y Ravdin 1988a) en E. histolytica: la citólisis amibiana se incrementa con esteroides de forbol, activadores de la proteína cinasa C (Petri y Ravdin 1987, Long-Krug y Ravdin 1988a). Además se ha encontrado en trofozoitos amibianos inositol trifosfato - - (Long-Krug y Ravdin 1988a-b), fosfatidil inositol (Gitler y Mirelman 1986) y actividad de fosfolipasa membranar (Gitler y Mirelman 1986, Long-Krug y Ravdin 1988a). Este sistema transductor de señales parecería hallarse en relación con varios procesos agresores de la amiba (sección 1.3).

b) Inducción a través del encendido de un programa general que altera de manera temporal o permanente la fisiología de la célula- la opción de cambios a nivel de genoma resulta particularmente atractiva y posible, siendo que existen diferencias en los patrones de la restricción entre E. histolytica y otros tipos de amibas menos virulentas (Battacharya et al. - 1988), y entre cepas virulentas y no virulentas de E. histolytica (Garfinkel et al. 1989).

En este mecanismo de inducción, la amiba se volvería potencialmente virulenta por medio del cambio genético; la manifestación en sí de los mecanismos de agresión estaría controlada por un sistema modulador, pudiendo ser el que utiliza Ca^{++} como segundo mensajero. Este sistema transductor funcionaría paliando o estimulando la virulencia según si las condiciones se vuelven o no estables, o según si retornan o no dichas condiciones. El cambio genético sería un proceso temporal o permanente estimulado por cambios específicos en las condiciones del medio (sección 1.5.III). Si es temporal, deben haber ciertas condiciones específicas en las que el genoma retorna a su configuración original de no virulencia. Si es permanente, la amiba sería siempre potencialmente virulenta. Los cultivos de amibas en el laboratorio sugieren la posible existencia de cambios genéticos inductores de virulencia permanentes: tanto las amibas virulentas como las que perdieron la virulencia (medida por la formación de abscesos hepáticos en hamsters) por prolongación de cultivo, presentaron el mismo nivel elevado de fagocitosis (sección 4.2.IV); esto podría interpretarse como una inducción de virulencia a través de un cambio genético que permanece en la amiba de manera permanente, lo que se manifiesta en el carácter altamente fagocítico que se mantiene durante la prolongación del cultivo. Sin embargo, esta prolongación posiblemente provoca que las condiciones del medio se estabilizan a lo largo del tiempo, lo que hace que las amibas pallen su virulencia -presumiblemente a través de algún sistema modulador-

y pierdan la capacidad de desarrollar abscesos hepáticos. Posiblemente el sistema modulador reactivaría dicha capacidad de presentarse el cambio adecuado en las condiciones del medio.

En resumen, se requiere determinar si la estructura genética para la expresión de virulencia se halla presente en la amiba de manera virtual, y es accesible inmediatamente a estímulos del mecanismo inductor, o de manera potencial, y se requiere elaborar por el mecanismo inductor en el momento de recibir los estímulos específicos. Independientemente del mecanismo inductor de virulencia amibiana que resulte ser el correcto, éste debe poder explicar de que manera regula cada mecanismo de agresión por separado y como los conjunta (sección 1.5.II), a través de la regulación de procesos celulares tales como la inducción de lectinas y de Receptocinesis (sección 4.3).

1.6 Objetivos

El objetivo general de la presente tesis fue comparar los mecanismos de agresión de E. histolytica, potencialmente virulenta y patogénica para humanos, con los de E. invadens, generalmente no virulenta ni patogénica para humanos aunque sí para ciertos reptiles carnívoros (Neal 1988, Meerovitch y Chadee 1988), tratando de encontrar rasgos distintivos que expliquen la capacidad de E. histolytica para invadir y producir enfermedad en la especie humana. Dos variantes de E. histolytica fueron también comparadas en algunos experimentos: una capaz de producir abscesos hepáticos en hamsters (AH), y una segunda -- (No-AH) que perdió dicha capacidad durante la prolongación del cultivo axénico (Mattern et al. 1982); ambas variantes fueron originalmente aisladas de pacientes sintomáticos.

Los objetivos particulares están enmarcados dentro de dos enfoques distintos:

1) Bioquímica de Proteasas- Anteriormente se realizó un estudio sistemático por medio de inhibidores para determinar y analizar las clases catalíticas de E. histolytica (Pérez-Montfort 1987). En el presente trabajo, el primer objetivo particular consistió en ampliar dicho estudio mediante el uso de -- inhibidores adicionales para E. histolytica, y realizar además el estudio completo para E. invadens. Esto se realizó midiendo la actividad proteolítica con un método colorimétrico, y -- analizando el efecto de distintos inhibidores de proteinasas - (Umezawa y Aoyagi 1977, Barret 1977, Pérez-Montfort 1987, Lushbaugh 1988b, McKerrow 1989). El segundo objetivo particular -- fue comparar, entre ambos tipos de amiba, las siguientes características bioquímicas de las proteinasas: intensidad de actividad proteolítica, número y tamaño, por medio de electroforesis en gel de sustrato, y sensibilidad de la actividad proteolítica ante barridos de temperatura y pH.

2) Acción citotóxica in vitro - El tercer objetivo particular consistió en determinar si existen diferencias entre -- E. histolytica y E. invadens respecto a la interacción in vitro con el mismo tipo de células blanco: macrófago peritoneal de rata (MPr). Para ello se utilizó microscopía de luz y la -- técnica de exclusión por azul Tripan, lo que permite determinar la desaparición de las células blanco, es decir, la fagocitosis, y la cantidad de células teñidas con azul tripan o muerte celular (Ravdin et al. 1980, Ravdin y Guerrant 1981, Becker et al. 1988).

El cuarto objetivo particular fue comparar la sensibilidad de la fagocitosis de ambos tipos amibianos ante distintas concentraciones Galactosa (Gal) y Glucosa (Glc), carbohidratos que inhiben lectinas superficiales de E. histolytica que interviene en la citólisis y adherencia (Ravdin y Guerrant 1981, -- Ravdin et al. 1988a, 1989b, Ravdin 1988b, 1989a, Orozco -- et al. 1982b y c, Gitler y Mirelman 1986, Petri y Ravdin 1987).

Estos experimentos se realizaron para determinar si existen - lectinas específicas para estos monosacáridos que intervengan en el proceso de fagocitosis en E. histolytica y E. invadens.

El quinto objetivo particular consistió en elaborar un mo delo teórico que explique cuál es el mecanismo mediante el - - cual E. histolytica mata a las células blanco.

2 MATERIALES Y METODOS

I. Cultivos Axénicos Amibianos

E. histolytica de la cepa HM-1 y E. invadens de la cepa - PZ, fueron crecidas axénicamente en medio TYI-S-33 (Diamond et al. 1978) o BI-S-33 (Diamond 1983) a 37°C y a temperatura ambiente respectivamente. Para todos los experimentos se utilizaron trofozoitos cosechados al final de la fase logarítmica - de crecimiento.

II. Animales

Se utilizaron ratas Wistar hembras de 400 a 500 g de peso, las cuales se mantuvieron en jaulas de plástico y fueron - alimentadas con bolas de Purina y agua ad libitum.

III. Actividad Proteolítica

La actividad proteolítica fue determinada por un método - colorimétrico utilizando azocaseína (Sigma Chemical Co.) como sustrato. Los trofozoitos fueron lavados tres veces con una solución amortiguadora de fosfato de potasio 15 mM, pH 7.2 y - cloruro de sodio 184 mM (PBS-A), por centrifugación a 150 x g por 5 min a 10°C. Las células fueron lisadas con Tritón X- -

100 o.5% (v/v) e incubadas a 4°C por 1 hora. El lisado fue -- centrifugado a 12,000 x g por 15 min a 4°C y el sobrenadante - fue colectado como fuente de proteasas y congelado a -70°C. -- Alternativamente, se midió la actividad proteolítica de amibas vivas.

La proteólisis fue determinada en 40 ul de sobrenadante, equivalente a 40,000 trofozoitos, o en 50 ml de medio con - -- 50,000 ó 100,000 amibas viables. Los sobrenadantes o trofozoí- tos fueron incubados con 1 mg de substrato a 37°C por diferen- tes periodos de tiempo en 1 ml de Tris-(hidroximetil)aminomet- no (Tris), pH 7.5. La proteólisis se detuvo con 1 ml de ácido tricloroacético (10%) a 4°C. Los tubos se centrifugaron a 2000 x g por 7 min y el sobrenadante se leyó a 366 nm.

Los resultados se graficaron como absorbencia contra tiem- po (donde el tiempo máximo fue de 80 min). El porciento de -- inhibición fue calculado para cada período como $(a-b) \times 100/a$, donde "a" es la cantidad de un producto (absorbencia en este - caso) en la ausencia de inhibidor y "b" es aquella en presen- cia de inhibidor (Umezawa y Aoyagi 1977). Posteriormente se - obtuvo el promedio de inhibición de todos los tiempos.

Los inhibidores utilizados fueron:

P-hidroximercuribenzoato (PHMB), N-etilmaleimida (NEM), - iodoacetamida (IA), antipaina, aprotinina, ácido etilendiamin- tetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis(beta-amino-etile-- ter) N,N -tetraacético (EGTA), leupeptina, pepstatina A, fluo- ruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), inhibidor de tripsina de so- ya (SBTI), N-alfa-p-tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK), -- N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK), y orto-fenan- trolina (O-phe), de Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO. USA); (N-(N-(L-3trans-carboxioxiran-2-carbonil)-L-leucil)-agmatina) - (E-64),

(N-(alfa-L-rhamnopiranosiloxihidroxifosfonil)-L-leucil-L-triptofán) (fosforamidón), de Boehringer Co., (Mannheim, Alemania) y alfa-2-macroglobulina humana (a2m), purificada según el método de Kurecki et al. (1979).

Cuando las actividades proteolíticas se midieron a distintos valores de pH, se utilizó polvo de azur como el sustrato en lugar de azocaseína, y se usaron las siguientes soluciones amortiguadoras: citrato, fosfato y carbonato a 0.05 M, para valores de pH 3-5, 6-8 y 9-10 respectivamente (Avila et al. -- 1985).

IV. Coincubaciones

Las ratas fueron estimuladas a producir células peritoneales con una inyección intraperitoneal de 6 ml de proteosa peptona (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) al 12.5% en PBS-A. A los 3 ó 4 días, las ratas se anestesiaron con éter y una vez dispuestas en una tabla quirúrgica se les inyectó intraperitonealmente de 15 a 20 ml de medio TYI-S-33 sin antibióticos (Diamond et al. 1978). Inmediatamente después las ratas fueron sometidas a un lavado peritoneal por masaje durante 5 min para desprender las células de las paredes del peritoneo, luego de lo cual se recuperó el medio con células a través de la aguja por expresión de la cavidad peritoneal. Las células fueron lavadas una o dos veces con 6 ó 7 ml de medio TYI-S-33 fresco. Los eritrocitos contaminantes se eliminaron por medio de choques hipotónicos. La población de macrófagos se enriqueció por adhesión a cajas de Petri de vidrio durante 2 hr a 37° C, luego de las cuales se desechó con cuidado el medio y fueron desprendidos los macrófagos con chorros de medio fresco a presión utilizando pipetas Pasteur. Posteriormente, se agregaron 0.05 ml de amibas a 0.95 ml de macrófagos peritoneales -- (MPr) en una proporción aproximada de 50 MPr/amiba, con unas 100,000 amibas por tubo Eppendorf. Las células se contaron y

su viabilidad se determinó por exclusión de azul Tripan. Para las coincubaciones en paquete, las células se centrifugaron a 1500 rpm en una microfuga Beckman modelo 11, y el precipitado con medio se incubó por 2 hr a 37°C en el caso de E. histolytica, y a temperatura ambiente en el caso de E. invadens. Para las coincubaciones de células en suspensión, se procedió directamente (sin centrifugación) a la coincubación de los tubos. - Al final de la coincubación, nuevamente fueron contadas las células y determinada su viabilidad.

Tanto la fagocitosis como la muerte celular se calcularon corrigiendo para la cantidad de amibas y para la cantidad inicial de MPr, obteniendo el porciento de células fagocitadas o lisadas por amiba:

1) % MPr fagocitados/amiba = $100 \times (\text{total MPr } 0 \text{ hr} - \text{total MPr } 2 \text{ hr}) / (\text{promedio amibas} \times \text{total MPr } 0 \text{ hr})$

2) % MPr muertos/amiba = $100 \times (\text{MPr muertos } 2 \text{ hr} - \text{MPr muertos } 0 \text{ hr}) / (\text{promedio amibas} \times \text{total MPr } 0 \text{ hr})$

donde "total" se refiere a los totales promediados de un experimento y su duplicado, y el "promedio amibas" toma en cuenta los valores a las 0 y 2 hr; el número de amibas y su viabilidad no cambiaron significativamente a lo largo de 2 hr con respecto a las incubaciones de amibas sin MPr. Para calcular el porciento control de fagocitosis o muerte celular -en ausencia de amibas- se utilizó el número promedio de amibas de la coincubación correspondiente a ese control. A la fagocitosis negativa, ya sea en los tubos tratados con amibas o en los controles, se le asignó el valor de cero. Los valores netos de fagocitosis o muerte celular se obtuvieron restando los valores -- control a los experimentales. Para inhibir la fagocitosis amibiana se utilizó D(+) galactosa, de Sigma Chemical Co., (St. - Louis, MO. USA), y D(+) glucosa, de Merck Co.

V. Estadística

Todos los resultados están expresados como el promedio \pm la desviación estándar o el error estándar de la media. La prueba "t" de Student para muestras desapareadas fue utilizada para determinar la significancia.

3 RESULTADOS

3.1 Proteinasa

La tabla IV muestra el efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad proteolítica de los lisados amibianos. Puede apreciarse que la mayor inhibición para ambos tipos de amibas fue propiciada por los inhibidores para proteasas de cisteína: entre 84 y 103% y con un promedio de 91%. Los inhibidores para proteasas de serina inhibieron en menor grado entre 0 y 20% y con un promedio de 12%. El inhibidor específico para metaloproteasas (fosforamidón) y para carboxiproteasas (pepstatina - A), no tuvieron prácticamente ningún efecto inhibitorio sobre la actividad de ambos tipos de lisados. Con inhibidores para proteinasas de cisteína y serina, y a2m, inhibidor de todas -- las clases catalíticas, se obtuvo una inhibición de 71 a 109%, con un promedio de 88%, valores semejantes a los obtenidos con inhibidores de cisteína.

Distintas concentraciones de agentes quelantes (EDTA, EGTA, y O-fenantrolina) tuvieron efectos diferentes según el tipo amibiano (Tabla IV). Para reforzar este hallazgo, se extendió el estudio probando la sensibilidad de la actividad proteolítica ante barridos de concentraciones de estos agentes y se obtuvieron patrones de proteólisis diferenciales según el tipo

TABLA IV

Inhibidor(es)	Clase de Proteinasa inhibida *	% de Inhibición ± S.D.	
		E. invadens	E. histolytica
IA (2 mM)	c	103 ± 2 (10)	92 ± 5
PHMB (1 mM)	c	96 ± 1 (10)	92 ± 2
NEM (2 mM)	c	86 ± 9 (10)	84 ± 2
E-64 (5.6 ug/ml)	c	89 ± 6 (8)	86 ± 1 (8)
E-64 (140 ug/ml)	c	96 ± 0 (2)	90 ± 0 (2)
SBTI (100 ug/ml)	s	16 ± 3 (10)	18 ± 9
PMFS (1 mM)	s	8 ± 7 (10)	0
Aprotinina (4 ug/ml)	s	0 ± 2 (20)	3 ± (20)
Aprotinina (100 ug/ml)	s	20 ± 2 (4)	12 ± (2)
Pepstatina A (1 ug/ml)	carb	-6 ± 9 (10)	0
EDTA (2 mM)	m	8 ± 4 (30)	13 ± 1
EDTA (20 mM)	m	31 ± 6 (40)	33 ± 13
EGTA (2 mM)	m	-4 ± 3 (20)	17 ± 4
EGTA (20 mM)	m	5 ± 2 (20)	-22 ± 2
O-fen (2 mM)	m	-2 ± 2 (10)	33 ± 9 (10)
O-fen (15 mM)	m	16 ± 3 (10)	11 ± 7 (10)
Fosforamidón (4 ug/ml)	m	0 ± 3 (20)	0 ± 3 (20)
Fosforamidón (100 ug/ml)	m	2 ± 1 (2)	0 ± 2 (2)
TLCK (2 ug/ml)	c+s	95 ± 1 (16)	91 ± 2 (16)
TLCK (50 ug/ml)	c+s	97 ± 0 (4)	95 ± 1 (4)
TPCK (6 ug/ml)	c+s	90 ± 4 (8)	65 ± 4 (8)
TPCK (150 ug/ml)	c+s	93 ± 3 (2)	91 ± 0 (2)
Antipaina (2 ug/ml)	c+s	64 ± 10 (20)	34 ± 4 (20)
Antipaina (50 ug/ml)	c+s	80 ± 0 (4)	75 ± 1 (2)
PHMB (1 mM) + SBTI (100 ug/ml)	c+s	93 ± 3 (10)	109 ± 9
Leupeptina (50 uM)	c+s	71 ± 11 (10)	79 ± 1
a2m (5 mg/ml)	t	98 ± 2 (10)	77 ± 8

* c=sisteina, s=serina, carb=carboxilo, m=metaló, t=todas

Comparación entre *E. histolytica* y *E. invadens* en cuanto al efecto de varios tipos de inhibidores de proteinasas sobre la actividad proteolítica de lisados -- amibianos. La proteólisis y el % de inhibición se midió según lo especificado en Materiales y Métodos. El número dentro del paréntesis indica la cantidad de experimentos. Cada experimento representa un tubo control y un tubo tratado. Los datos que no presentan número de experimentos fueron tomados de Pérez-Montfort et al. 1987.

de amiba (Figs. 4, 5 y 6).

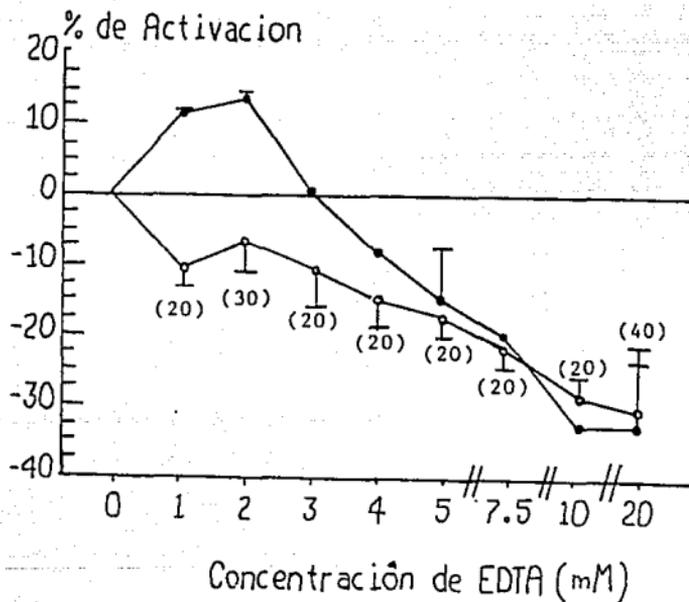
Como puede verse en la Figura 4, el EDTA aumentó la actividad proteolítica de E. histolytica hasta 2 mM, y para concentraciones mayores produjo un efecto inhibitorio hasta alcanzar un nivel de aproximadamente 33% de inhibición a 10 mM. En cambio, para E. invadens, EDTA tuvo un efecto inhibitorio casi -- continuo hasta alcanzar un 31% de inhibición con una concentración de 20 mM (Fig. 4).

En la Figura 5 se aprecia que el EGTA propició un efecto de activación continuo, pero variable, en los lisados de E. histolytica; mientras que en E. invadens, el efecto del EGTA alcanzó un pequeño nivel de activación en las concentraciones de 2 a 3 mM, para luego inhibir ligeramente la proteólisis hasta un 5% con 20 mM (Fig. 5).

También el barrido de O-phe produjo patrones de proteólisis diferentes para cada tipo amibiano (Fig. 6). En el caso de E. histolytica, O-phe propició un pico de inhibición máximo de 34% a 1 mM, y un pico de activación máximo de -2% de inhibición a 4 mM, que siguió con una inhibición casi continua para terminar con un 11% a 15 mM. El efecto general de O-phe en -- E. histolytica fue inhibitorio con un promedio de 12.5%. En cuanto a E. invadens, O-phe produjo dos picos de activación, -- uno de -7% a 3 mM y otro de - 10% a 10 mM, además de un pico -- inhibitorio de 7% a 7.5 mM. a partir de 10 mM, O-phe inhibió súbitamente la proteólisis de E. invadens, hasta llegar a un máximo de 16% a 15 mM (Fig. 6). En E. invadens, el efecto general de la O-he fue de activación, con una inhibición promedio de -3.3%.

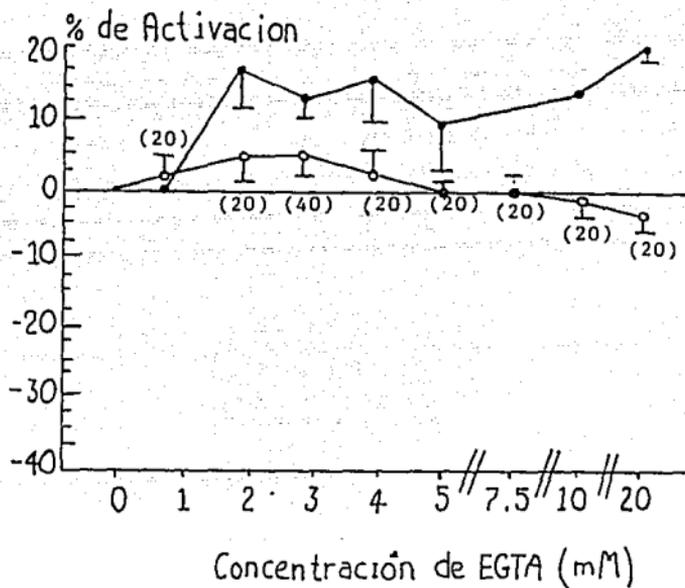
E. invadens mostró consistentemente una actividad sobre -- azocaseína superior a la de E. histolytica (Figura 7). En promedio, E. invadens mostró una actividad proteolítica de $0.72 \pm$

FIGURA 4



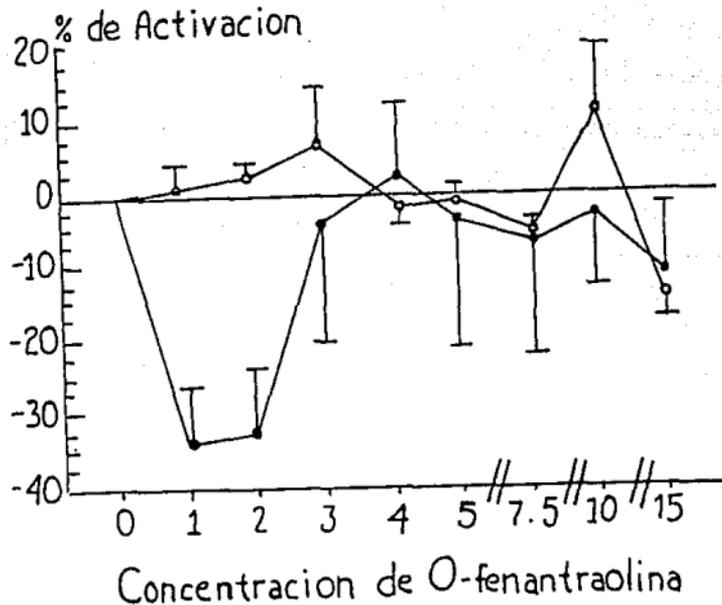
Efecto de diferentes concentraciones de EDTA sobre la actividad proteolítica de lisados amebianos. La actividad proteolítica y el % de inhibición se midió como se especifica en Materiales y Métodos. El % de -activación = % de inhibición x -1. (●) *E. histolytica*; (○) *E. invadens*; (I) representa la desviación estándar. El número dentro del paréntesis indica la cantidad de experimentos. Cada experimento representa un tubo control y un tubo tratado. Los datos para *E. histolytica* fueron tomados de Pérez-Montfort et al. 1987.

FIGURA 5

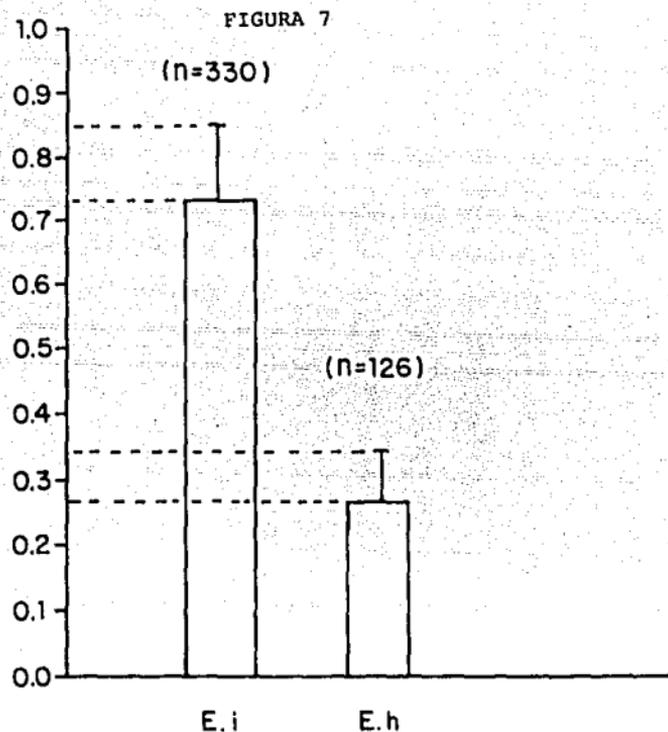


Efecto de diferentes concentraciones de EGTA sobre la actividad proteolítica de lisados ambientales. La actividad proteolítica se midió como se especifica en Materiales y Métodos. El % de activación = % de inhibición x -1. (●) *E. histolytica*; (○) *E. invadens*; (l) representa la desviación estándar. El número dentro del paréntesis indica la cantidad de experimentos. Cada experimento representa un tubo control y un tubo tratado. Los datos para *E. histolytica* fueron tomados de Pérez-Montfort et al. 1987.

FIGURA 6



Efecto de diferentes concentraciones de O-fenantrolina sobre la actividad proteolítica de lisados ambientales. La actividad proteolítica se midió como se especifica en Materiales y Métodos. El % de activación = % de -- inhibición x -1. (●) *E. histolytica*; (○) *E. invadens*; (1) representa la desviación estándar. El número de experimentos para cada concentración fue de 10, donde cada experimento representa un tubo control y un tubo tratado.



Actividad proteolítica de varios lisados ambianos medida a los 80 min. La actividad proteolítica se determinó como se especifica en Materiales y Métodos. (E.i) *E. invadens*; (E.h) *E. histolytica*. (n) - representa el número de experimentos por duplicado (l) representa el error estándar.

0.13 (S.D. del promedio, equivalente a S.E.) ua, mientras que la actividad promedio de E. histolytica fue de 0.27 ± 0.07 ua; en otras palabras, la actividad de E. histolytica fue en promedio 62.5% menor que la de E. invadens. Asimismo, la proteólisis de E. histolytica con respecto a E. invadens fue menor en dos fuentes distintas de proteinasas (lisados y trofozoitos enteros), en dos parámetros diferentes medidos usando la misma fuente (número de amibas y cantidad de proteína), y en dos valores distintos del mismo parámetro (número de amibas) (Tabla V).

En el laboratorio también se analizaron comparativamente otras características bioquímicas de las proteinasas de ambos tipos amibianos. Se hizo una comparación de la dependencia -- del pH, en la actividad proteolítica de los lisados amibianos -- en polvo de azur (Fig. 8), y mostró que tanto la actividad -- proteolítica en el pH óptimo así como aquella a pHs mayores, -- es significativamente mayor para E. histolytica (pH óptimo de 6) que para E. invadens (pH óptimo de 5). De pH 4 a 5, la activación es similar para ambos lisados. Con el aumento de temperatura (Fig. 9), la actividad proteolítica de ambos tipos de lisados se incrementó progresivamente y de manera similar hasta un máximo de actividad a los 60°C. A partir de este punto, la proteólisis se inhibió en mayor grado para E. invadens.

En cuanto al número y peso de las proteinasas, la Figura 10 muestra un zimograma representativo de los lisados amibianos para el que se utilizó la técnica de electroforesis en gel substrato (Pérez-Montfort et al. 1987, Ostoa-Saloma et al. -- 1989a). Puede apreciarse que los patrones de hidrólisis son -- muy distintos: E. histolytica muestra seis zonas de hidrólisis con PMs aparentes de 66, 58, 42, 31, 28, y 23×10^3 Kd (Fig. 10, barra B); mientras que E. invadens muestra sólo dos zonas con PMs aparentes de 52 y 45×10^3 Kd (Fig. 10, barra A).

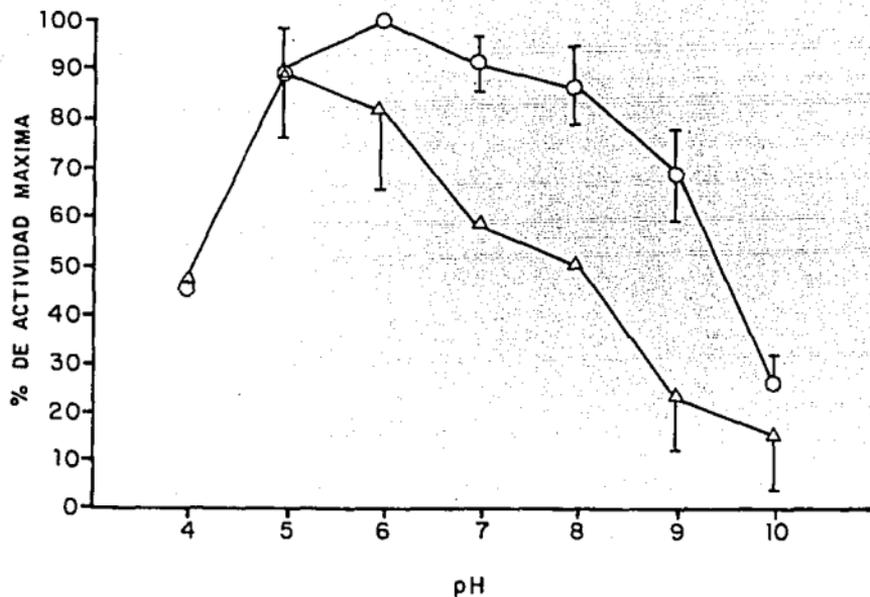
TABLA V

Comparación de la Actividad Proteolítica de Lisados
y Trofozoitos Ambianos

Fuente de Proteinasas	<u>E. histolytica</u>	<u>E. invadens</u>	$100\% - \frac{(E.His.)}{X 100\%}$ E. invadens
Misma cantidad de amibas en lisado: <u>40,000</u>	0.214 \pm 0.053(10)	0.347 \pm 0.085(10)	38.3 %
Misma cantidad de proteína en lisado: <u>19.42 mg/ml</u>	0.126 \pm 0.029(10)	0.336 \pm 0.082(10)	62.5 %
Misma cantidad de trofozoitos via- bles: <u>50,000</u>	0.039 \pm 0.005 (8)	0.062 \pm 0.0003(8)	37.1 %
Misma cantidad de trofozoitos via- bles: <u>100,000</u>	0.056 \pm 0.005(16)	0.062 \pm 0.008(16)	9.7 %

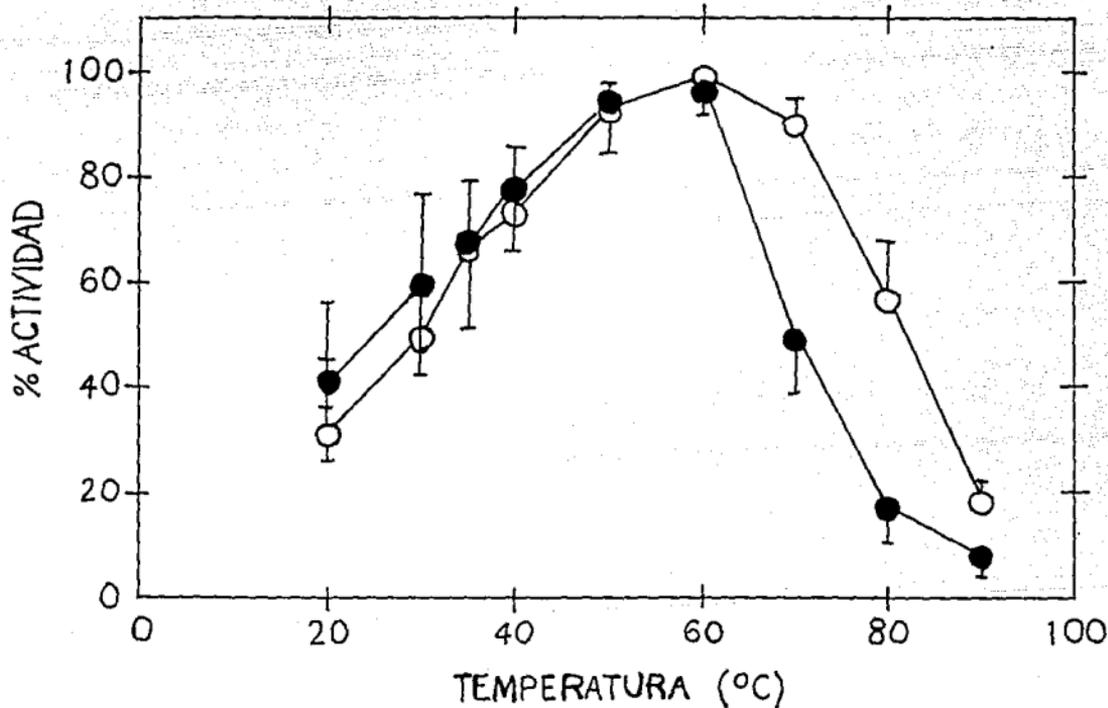
Comparación de la actividad proteolítica de lisados y trofozoitos de E. invadens y E. histolytica. La digestión de azocaseína se midió como se especifica en Material y Métodos. Los resultados se presentan como la absorbencia promedio \pm el error estándar. El número dentro del paréntesis indica la cantidad de experimentos donde cada uno representa un tubo control y un tubo experimental. La cantidad de proteína se determinó por la reacción de Biuret.

FIGURA 8



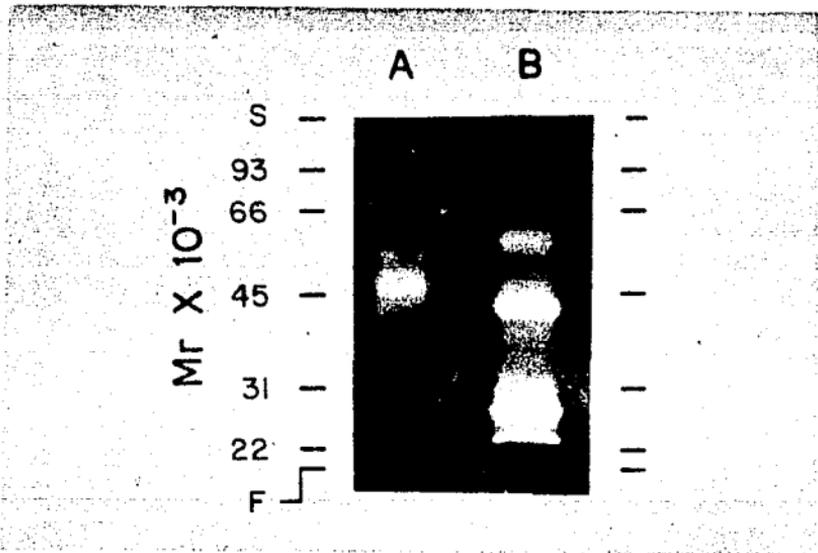
Comparación de la dependencia de pH de la actividad proteolítica en lisados de *E. histolytica* (o) y *E. invadens* (Δ). Es substrato utilizado para la digestión en estos ensayos fue polvo de azul (Avila et al. 1985). Los experimentos para obtener los datos de esta figura fueron realizados por Pedro Ostoa - Saloma.

FIGURA 9



Comparación de la dependencia de temperatura de la actividad proteolítica en lisados de *E. histolytica* (o) y *E. invadens* (●). Los ensayos se realizaron a pH 7.5 por 30 min. Los experimentos para obtener los datos de esta figura fueron realizados por Laila Gutiérrez Kobe.

FIGURA 10



Zimograma de un gel sobre el que los lisados de 20,000 amibas fueron analizados. (A) *E. invadens* y (B) *E. histolytica*. El gel substrato contenía gelatina. S marca el final del gel acumulador, y F es el frente de tinta. El zimograma fue realizado por Pedro Ostoa Saloma.

3.2 Acción Citotóxica In Vitro.

La tabla VI muestra una comparación de los resultados de las coincubaciones del sistema amiba-MPr realizadas bajo dos condiciones distintas: en suspensión o sin centrifugación, y en paquete o con centrifugación de las células. Tres puntos importantes pueden deducirse de la Tabla VI: 1) los valores para fagocitosis y muerte celular obtenidos con coincubaciones en paquete son de 2 a 6 veces mayores que los obtenidos con coincubaciones en suspensión para cada tipo de amiba; debido a esto, las subsiguientes coincubaciones se realizaron en paquete. 2) Independientemente de la forma en que se realizó la coincubación y del tipo amibiano, los valores de fagocitosis son siempre mayores que los de muerte celular; y 3) la fagocitosis de E. histolytica es siempre mayor que la de E. invadens.

La figura 11, muestra una comparación de muerte celular y fagocitosis respectivamente, entre coincubaciones amiba-MPr e incubaciones de MPr solos, para cada tipo de amiba. Puede notarse que únicamente para la fagocitosis, las coincubaciones aumentaron significativamente en comparación con sus respectivos controles. Cuando se compararon los valores netos (experimentales - controles) de la fagocitosis y muerte celular amibianas (las siguientes tablas y figuras se refieren a los valores netos), se vio que la fagocitosis es consistentemente mayor que la muerte para todas las amibas, pero sólo es significativamente mayor en las variantes de E. histolytica (Tabla VII). Para el caso de E. histolytica no virulenta (No-AH), la muerte celular es un 8% del valor de la fagocitosis, y la muerte celular de E. histolytica virulenta (AH) es un 11% de la fagocitosis. En cambio, la muerte celular de E. invadens es un 47% del valor de su fagocitosis. La muerte neta de todos los tipos amibianos fue prácticamente la misma; asimismo, los valores de fagocitosis neta de E. histolytica virulenta y no virulenta no variaron entre sí significativamente. No obstante, -

TABLA VI

Comparación de coincubaciones del sistema Amiba-MPr
realizadas en suspensión y en paquete

Amiba	Coincubaciones en Suspensión		Coincubaciones en Paquete	
	Muerte \pm S.E.	Fag. \pm S.E.	Muerte \pm S.E.	Fag. \pm S.E.
<u>E. histolytica</u>	0.02 \pm 0.05 (34)	0.30 \pm 0.07 (34)	0.012 \pm 0.09 (10)	1.58 \pm 0.22 (10)
<u>E. invadens</u>	0.04 \pm 0.05 (35)	0.15 \pm 0.04 (35)	0.16 \pm 0.14 (10)	0.34 \pm 0.13 (10)

Comparación de coincubaciones del sistema amiba-MPr realizadas en suspensión y en paquete. Las coincubaciones se llevaron a cabo como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados de estos experimentos se presentan como % / amiba \pm el error estándar (S.E.), y representan los valores netos: valores experimentales valores control. El número dentro del paréntesis indica la cantidad de experimentos por duplicado realizados para las coincubaciones experimentales. Los resultados de E. histolytica pertenecen a la variante No-AH.

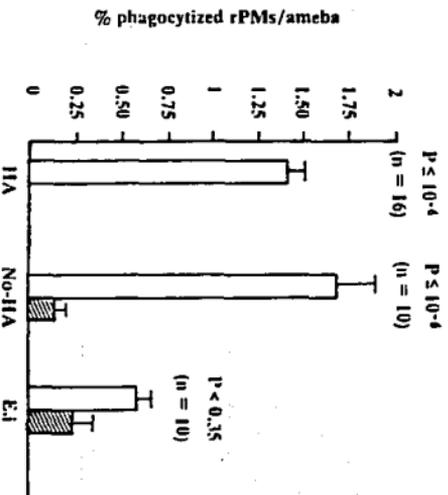
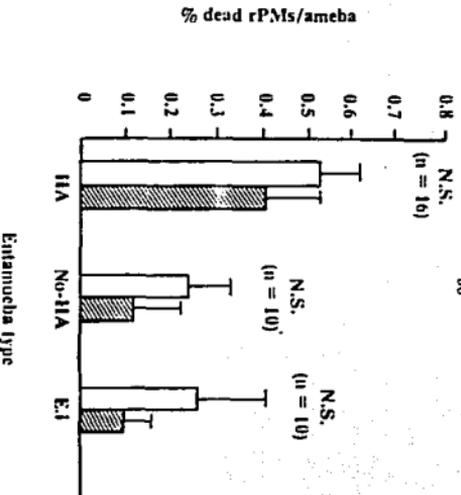


FIGURA 11

Muerte celular y fagocitosis de las variantes AH y no-AH de *E. histolytica* y *E. invadens* (E:1). Ambos procesos celulares se midieron como se especifica en Materiales y Métodos. Los resultados se presentan como la media \pm la error estándar de la media. (n) representa el número de experimentos por duplicado. Barras abiertas, colonizaciones de amebas y células MPR; barras cerradas u oscuras, incubaciones control de MPR solos.

TABLA VII

Comparación de la Muerte Celular y la Fagocitosis Netas de
E. histolytica y E. Invadens

	Muerte Celular Amiba (% MPr muertos/amiba)	Fagocitosis (% MPr fagocitados/amiba)
AH	0.15 ± 0.15 a d	1.38 ± 0.07 b
No-AH	0.12 ± 0.09 a d	1.58 ± 0.22 b
E.i	0.16 ± 0.14 a d	0.34 ± 0.13 c

a No significativo comparado con los otros valores de muerte celular.

b No significativo comparado con la fagocitosis de la otra variante.

c Significativo comparado con la fagocitosis de AH ($p \leq 10^{-6}$) y No-AH ($p < 1.33 \cdot 10^{-4}$).

d Significativo comparado con la fagocitosis de ambas variantes de E. histolytica ($p < 4 \times 10^{-5}$), y no significativo comparado con la fagocitosis de E. invadens.

Comparación de la muerte celular y la fagocitosis netas de E. histolytica y E. invadens. Las concubaciones se realizaron como se especifica en Materiales y Métodos. Los resultados son los valores netos (valores experimentales - valores control) y se presentan como \bar{X} / amiba ± el error estándar. AH y No-AH son las dos variantes distintas de E. histolytica utilizadas en este trabajo; E.i es E. invadens.

la fagocitosis de ambas variantes de E. histolytica fue significativamente mayor que la de E. invadens (Tabla VII).

La galactosa (Gal) y la glucosa (Glc) son carbohidratos - que inhiben lectinas superficiales de E. histolytica que interviene en la muerte celular y la adherencia (Ravdin y Guerrant 1981, Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1988b, 1989a, Ravdin et al. 1989b, Orozco et al. 1982b y c, Gitler y Mirelman 1986, Petri - Ravdin 1987). Las Tablas VIII y IX muestran el efecto de estos azúcares sobre la muerte celular y la fagocitosis netas -- respectivamente para el sistema amiba-MPr al usar coinubaciones en paquete. En cuanto a la muerte celular, se aprecia que no existieron diferencias significativas entre los valores de cada tipo de amiba, y entre los valores para E. histolytica y E. invadens (Tabla VIII). En cambio, la fagocitosis sí sufrió cambios importantes según el del tipo de azúcar y de amiba: la Gal (4%) ejerció una inhibición total en la fagocitosis de E. histolytica, mientras que la Glc (4%) ejerció una inhibición - parcial no significativa. Para E. invadens, la Gal (4%) sí -- ejerció una inhibición parcial significativa de un 75% (Tabla IX).

En la Figura 12 se muestran dos micrografías representativas de las coinubaciones de E. histolytica con MPr a las 2 hr sin o con Gal (4%). Se aprecia que sin Gal algunas amibas son capaces de fagocitar una gran cantidad de macrófagos, sin importar si están vivos o muertos (Fig. 12A). En experimentos - adicionales, se ha visto en coinubaciones con una mayoría de macrófagos muertos, que E. histolytica los fagocita con la misma efectividad con que fagocita macrófagos vivos (datos no mostrados). En estas coinubaciones sin inhibidor, sin embargo, - no todas los trofozoitos fagocitan de la misma manera, incluso algunos ni siquiera fagocitan (datos no mostrados). Con Gal - (4%) a las 2 hr, (o de manera equivalente a las 0 hr sin Gal) los trofozoitos no contienen macrófagos intracelulares (Fig. -

TABLA VIII

Efecto de Gal y Glc sobre la muerte de MPr por amibas

Tipo Amibiano	Muerte de MPr (% MM/Am) \pm S.E.		
	<u>Control</u> ^a	<u>Gal (4%)</u>	<u>Glc (4%)</u>
E. histolytica	0.10 \pm 0.06 N.S. ^b (n=7)	0.14 \pm 0.08 N.S. (n=8)	0.11 \pm 0.04 N.S. (n=8)
E. invadens	0.10 \pm 0.04 N.S. (n=9)	0.06 \pm 0.03 N.S. (n=7)	0.14 \pm 0.09 N.S. (n=6)

- a. Control negativo: sin azúcares. Promedio de controles apareados: hechos simultáneamente en los ensayos con azúcares.
- b. N.S.: no significativa la diferencia entre este promedio y todos los demás valores.

Efecto de Gal y Glc sobre la muerte de MPr ejercida por E. histolytica (AH) Y E. invadens. Las coincubaciones se realizaron como se describe en Materiales y Métodos, excepto que al medio de incubación se agregó una concentración de 4% de carbohidrato. Los valores netos se presentan como % MPr muertos/amiba (% MM/Am) y se calcularon como se especifica en Materiales y Métodos. El número dentro del paréntesis indica la cantidad de experimentos por duplicado realizados para las coincubaciones experimentales. S.E. es el error estándar de la media.

TABLA IX

Efecto de Gal y Glc sobre la fagocitosis de MPr por amibas

Tipo amibiano	Fagocitosis (% Fag/Am) + S.E.		
	<u>Control</u>	<u>Gal (4%)</u>	<u>Glc (4%)</u>
E. histolytica	1.20 ± 0.22 (n=7)	0 ± 0 *p<1x10 ⁻⁴ (n=8) a	0.89 ± 0.14 *N.S. (n=8) #p<0.03
E. invadens	0.44 ± 0.12 (n=9)	0.20 ± 0.09 *N.S. (n=7)	0.10 ± 0.07 *p<0.05 (n=6)

a. n= Número de experimentos por duplicado para las coincubaciones experimentales.

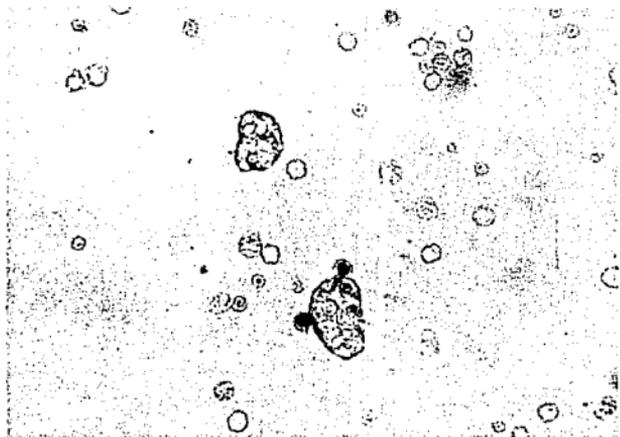
* con respecto a su respectivo control.

con respecto al control del otro tipo amibiano.

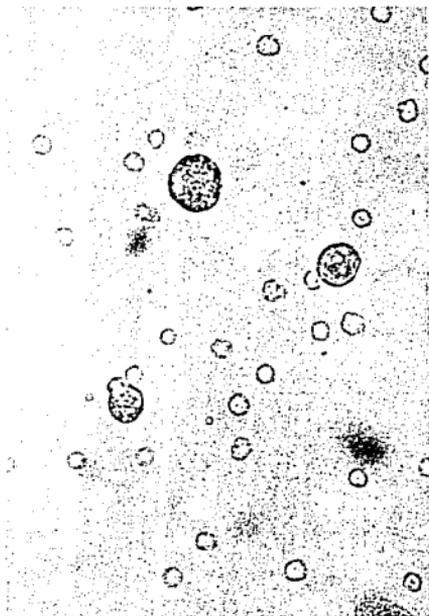
Efecto de Gal y Glc sobre la fagocitosis de MPr ejercida por E. histolytica (AH) y E. invadens. Las coincubaciones se realizaron como se describe en Materiales y Métodos, excepto que al medio de incubación se agregó una concentración de 4% de carbohidrato. Los valores netos se presentan como % MPr fagocitados/amiba (% Fag/Am) y se calcularon como se especifica en Materiales y Métodos. S.E. es el error estándar de la media.

FIGURA 12

A



B



Micrografías de coincubaciones de *E. histolytica* y MPr a las 2 hr sin (A) y con (B) Gal 4 (%). La amplificación es de 400 aumentos. Las micrografías fueron tomadas por Ruy Pérez-Tamayo.

12B); no obstante, en las coincubaciones con Gal (4%), algunas pocas amibas fagocitan ocasionalmente uno o dos macrófagos (datos no mostrados). También puede apreciarse claramente en las micrografías que la mortalidad de los macrófagos a las 2 hr es escasa y que no se incrementa significativamente con respecto a la mortalidad a las 0 hr (Fig. 12A y B), lo que apoya los resultados de la Figura 11.

Cuando los macrófagos o los trofozoitos de E. histolytica se preincubaron 30 min o más con Gal (4%) para luego coincubarse por 2 hr sin el inhibidor, el porcentaje de muerte celular no cambió significativamente con respecto al control negativo (Tabla X), lo que confirma los resultados de la Tabla - - VIII. Pero, es interesante que la fagocitosis tampoco cambió significativamente cuando los macrófagos o trofozoitos se pretrataron con Gal (4%), lo que indica el requerimiento continuo del carbohidrato en el medio para ejercer su efecto sobre la fagocitosis (Tabla X).

La Figura 13 muestra la sensibilidad de la fagocitosis neta en E. histolytica ante distintas concentraciones de Gal: -- desde Gal (1%), que no mostró efecto alguno, hasta Gal (4%), -- que inhibió la fagocitosis totalmente. Es notorio que la curva de inhibición resultante es semejante a una curva de inhibición por competencia (Fig. 13A). La fagocitosis de E. invadens en cambio, se inhibe totalmente con Glc (10%), pero puede notarse que ésta se inhibe de manera proporcional a la cantidad de inhibidor agregado (Fig. 13B).

TABLA X

Pretratamiento con Gal (4%) a MPr o amibas

<u>Condiciones de^a preincubación</u>	<u>% MM/Am + S.E.</u>	<u>% Fag/Am + S.E.</u>	<u>Número de exp.</u>
Control (+) ^b	0.14 ^c	0 ^c	1
Control (-)	0.12 ± 0.13 ^d	1.24 ± 0.14	2
Amibas (+)	0.08 ± 0.05 N.S.	1.57 ± 0.23 N.S.	6
Macrófagos (+)	0.12 ± 0.05 N.S.	1.80 ± 0.34 N.S.	6

a. Las células se preincubaron \geq 30 min.

b. (+) con Gal (4%), (-) sin Gal (4%) durante la preincubación.

c. Sin S.E. porque sólo se realizó un ensayo.

d. Las comparaciones se realizaron con respecto a los datos del control negativo.

Pretratamiento con Gal (4%) a MPr o *E. histolytica* (AH) y efecto sobre la acción citotóxica amibiana. Las coincubaciones se llevaron a cabo como se indica en Materiales y Métodos, excepto que las amibas o los MPr se preincubaron con Gal (4%) antes de las coincubaciones. Los resultados netos de las coincubaciones se presentan como % MPr muertos/amiba (%MM/Am) y % MPr fagocitados/amiba (% Fag/Am) ± el error estándar (S.E.).

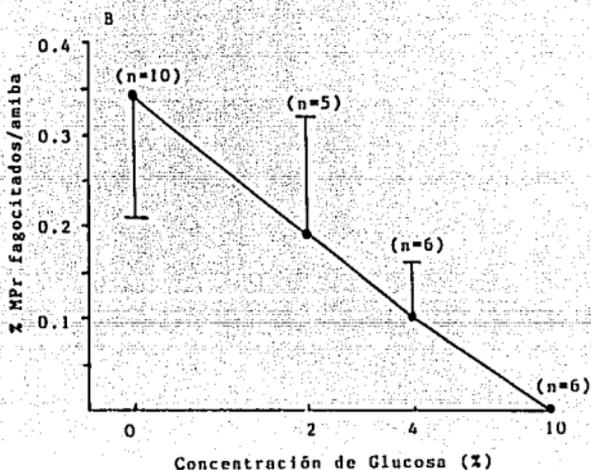
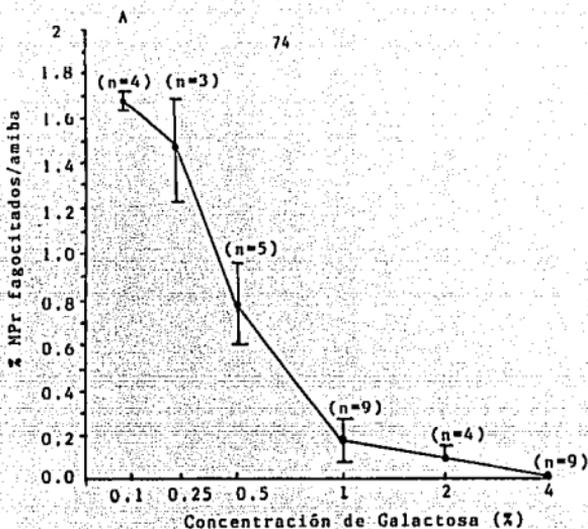


FIGURA 13

El efecto de Gal y Glc sobre la fagocitosis neta de *E. histolytica* y *E. invadens*. Las incubaciones se realizaron como se describe en Materiales y Métodos, excepto que al medio de incubación se agregó una concentración de 4% de carbohidrato. Los valores netos se presentan como % MPr fagocitados/amiba y se calcularon como se especifica en Materiales y Métodos. (A) *E. histolytica*, variante AH; (B) *E. invadens*. Los resultados representan la media \pm el error estándar.

4 DISCUSION

4.1 Proteinasas

I. Similitudes

A) Algunos trabajos previos mostraron que la clase catalítica principal de E. histolytica (Tabla III) y de E. invadens (Avila et al. 1985) es de cisteína. Los resultados de este trabajo confirman que las tiolproteinasas conforman la mayor parte de las proteinasas de ambos tipos amibianos, ya que los inhibidores específicos para esta clase abatieron entre un 80 y 100% la actividad proteolítica (Tabla IV). La clase catalítica de serina es la que le sigue en importancia, ya que inhibió la proteólisis de ambos tipos de lisados entre un 0 y un 20% (Tabla IV). Aunque metalo y carboxilproteinasas han sido reportadas para E. histolytica (Tabla III), con la resolución del método utilizado en el presente trabajo no pudieron ser detectadas actividades correspondientes a estas clases catalíticas, probando el fosforamidón y la pepstatina A como inhibidores específicos respectivamente (Tabla IV).

Los agentes quelantes inhiben las metaloproteinasas que--lando cationes divalentes necesarios para éstas. Estos agentes inhiben totalmente las metaloproteinasas a concentraciones de 1 a 2 mM, en las cuales, la mayoría de los quelantes usados no tuvieron un efecto inhibitorio sobre la proteólisis amibiana (Figs. 4, 5 y 6). No es posible que las inhibiciones observadas para E. invadens con EDTA (Fig. 4) y para E. histolytica con O-phe (Fig. 6) a concentraciones de 1 a 2 mM, se deban a efectos sobre metaloproteinasas; ya que el fosforamidón, inhibidor específico para metaloproteinasas (Barrett 1977, Umazawa y Aoyagi 1977), no tuvo efecto alguno sobre la proteólisis

sis a dos concentraciones probadas (Tabla IV), lo que indica - que de existir, las metaloproteinasas amibianas contribuyen -- muy poco a la proteólisis como para observar una inhibición en ausencia de su actividad. Asimismo, las activaciones a las -- concentraciones de 1 a 2 mM, no se deben a que los agentes hayan quelado cationes oxidantes que inhiban las tiolproteinasas, promoviendo así un efecto protector, ya que las inhibiciones arriba mencionadas (Figs. 4 y 6) constatan que no hubo una activación generalizada. Además de lo anterior, tanto las inhibiciones como las activaciones continúan en ausencia de cationes divalentes, es decir a concentraciones de quelantes superiores a 2 mM (Figs. 4, 5 y 6). Por lo tanto, se puede concluir que 1) tanto E. histolytica como E. invadens no poseen metaloproteinasas o las poseen en cantidades muy pequeñas; esto concuerda con el hecho de que sólo se ha reportado una metaloproteínasa (colagenasa) como tal en E. histolytica (sección 1.3.IV). Y 2), los efectos de los agentes quelantes, son probablemente efectos no-específicos sobre las proteinasas de cisteína y de serina de ambos tipos de amibas.

Con la utilización de inhibidores para dos clases catalíticas, cisteína y serina, y a2M, inhibidor de todas las clases catalíticas, se confirma nuevamente que las tiolproteinasas conforman la clase catalítica principal tanto de E. histolytica como de E. invadens, ya que inhibieron de manera semejante a como lo hacen los inhibidores de cisteína (Tabla IV). La razón por la que la antipaína y la leupeptina, inhibidores para las dos clases catalíticas, inhibieron menos que aquellos para cisteína se desconoce, pero es probable que se deba a una menor afinidad del inhibidor por las distintas proteinasas.

B) La segunda similitud se refiere al hecho de que ambos tipos de proteinasas se activaron de manera similar a pH 4 y a pH 5 (Fig. 8).

C) La tercera similitud consiste en que tanto las proteinasas de E. histolytica como las de E. invadens se activaron -

de forma similar ante el incremento de la temperatura de 20 a 60°C, para llegar ambas a un máximo de actividad a los 60°C -- (Fig. 9).

II. Diferencias

A) Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran -- claramente, que las proteinasas de E. histolytica reaccionaron de manera significativamente diferente a las de E. invadens ante varias concentraciones distintas de tres agentes quelantes (Tabla IV y Figs. 4, 5 y 6).

B) La actividad proteolítica de los lisados y de los trofozoitos de E. invadens sobre la azocaseína, fue consistentemente mayor que la de E. histolytica para el mismo número de amibas (Fig. 7 y Tabla V). En los lisados lo anterior resultó ser igualmente cierto para la misma cantidad de proteína (Tabla V). Se puede deducir del tamaño y número de las áreas de hidrólisis en el zimograma de ambos tipos de lisados (Fig. 10), que E. invadens no contiene una cantidad mayor de proteinasas que E. histolytica, sino al contrario. Por lo tanto, E. invadens debe poseer una o más proteinasas distintas de las de E. histolytica, que sean más aptas para degradar azocaseína.

C) Las curvas de dependencia de pH de lisados amibianos -- mostraron claramente patrones diferentes para cada tipo de amiba a partir de pH 5 a pH 10. Las proteinasas de E. histolytica demostraron una eficiencia significativamente mayor a pH -- neutro y básico (Fig. 8).

D) Las proteinasas de E. histolytica mostraron ser más resistentes a temperaturas arriba de los 60°C que las proteinasas de E. invadens (Fig. 9). La estabilidad de la actividad -- proteolítica en lisados de E. histolytica podría deberse a que la proteinasa de bajo PM aislada de este tipo de amiba (fue -- parcialmente purificada y pesó 21 Kd) funciona óptimamente a -- 85°C (Scholze y Werries 1984). Esta enzima podría correspon--

der a alguna de las tres zonas de hidrólisis de PM bajo observadas en los zimogramas obtenidos para E. histolytica en nuestro laboratorio (Fig. 10, barra B). En E. invadens, en cambio, no se observa ninguna proteinasa de bajo PM (Fig. 10, barra A), lo que correlaciona con una rápida desnaturalización a partir de los 60°C (Fig. 9).

E) Las diferencias en cuanto a número y pesos moleculares entre las proteinasas de E. histolytica y E. invadens son concluyentes: mientras que E. histolytica posee proteinasas de PM bajo, intermedio y alto (Fig. 10, barra B), E. invadens sólo posee proteinasas de PM intermedio (Fig. 10, barra A). Los PM de las proteinasas de E. histolytica en los zimogramas correlacionan con los PM de las tiolproteinasas estudiadas hasta la fecha (Tabla III). Esto se ve apoyado por experimentos adicionales en nuestro laboratorio, en los que la presencia de inhibidores de proteinasas de cisteína aborta la hidrólisis en el sustrato, lo que demuestra que las especies moleculares en los zimogramas son en efecto tiolproteinasas en su mayoría.

Dado todo lo anterior, se puede concluir que aunque las principales clases catalíticas de E. histolytica y E. invadens son de cisteína, existen diferencias cualitativas entre las tiolproteinasas de ambos tipos amibianos. Es posible que estas diferencias pudieran estar relacionadas, de alguna manera aun no determinada, con la capacidad lítica diferente que ambos tipos de parásitos tienen sobre tejidos de reptiles y mamíferos.

4.2 Acción Citotóxica In Vitro

I. La Fagocitosis como Mecanismo de Daño

Los resultados obtenidos con la técnica de coincubaciones aplicada al sistema amiba-MPr, sugieren que tanto en E. histolytica

tica como en E. invadens la fagocitosis es el proceso agresor principal sobre células MPr in vitro, ya que los valores promedio de la fagocitosis siempre resultaron ser mayores que los de la muerte celular (Tablas VI, VII y Fig. 11). Además, el porcentaje de muerte promovida por dos variantes de E. histolytica y por E. invadens en coinubaciones con MPr, no se incrementó significativamente con respecto a la muerte ocurrida en incubaciones de MPr solos (Figs. 11 y 12); lo que sí sucedió en el caso de la fagocitosis (Figs. 11 y 12). Si ambos tipos de amibas no ejercen una muerte significativa en este sistema, es de esperar que la actividad de muerte celular neta no cambie ante medios distintos; lo cual, fue en efecto observado al utilizar medio natural, con Gal (4%), y con Glc (4%) (Tabla -- VIII y Fig. 12). Los estudios hechos previamente con E. histolytica mostraron que la fagocitosis es asimismo el principal mecanismo de daño amibiano ejercido in vitro sobre células CHO, en los que la muerte celular neta fue de 8% (Ravdin y Guerrant 1981) a 29% (Ravdin et al. 1980) del valor de la fagocitosis; esto se parece al 8-11% de muerte celular con respecto a la fagocitosis obtenidos en este trabajo para E. histolytica No-AH y HA respectivamente (Tabla VII): en ambos casos la fagocitosis ocurrió en un grado mucho mayor. Más aún, mientras GalNac (4%) inhibió totalmente la muerte celular, la fagocitosis pudo continuar en un 50% del valor control sin GalNac (Ravdin y Guerrant 1981). Sin embargo, es importante señalar que no todos los trofozoitos de ambos tipos de amiba fagocitan por igual a lo largo de una coinubación, e inclusive algunos ni siquiera fagocitan (datos no mostrados), lo que confirma lo reportado por Orozco et al. de que la cepa HMI:IMSS es altamente heterogénea e incluye trofozoitos con alta, media y baja tasa de fagocitosis (Rodríguez y Orozco 1986).

La acción tóxica amibiana pudo haber operado también, ya que en algunas coinubaciones se observó que los macrófagos se arrugaron y encogieron, lo cual no ocurrió con los macrófagos

control en ausencia de amibas (datos no mostrados y no apreciables en la Fig. 12). Una explicación alterna a este fenómeno, el cual ya ha sido observado (Ravdin 1989a), podría relacionarse con la implementación en los macrófagos de un proceso de vesiculación que los hace resistir las citotoxinas amibianas - - (ver sección 1.3.V).

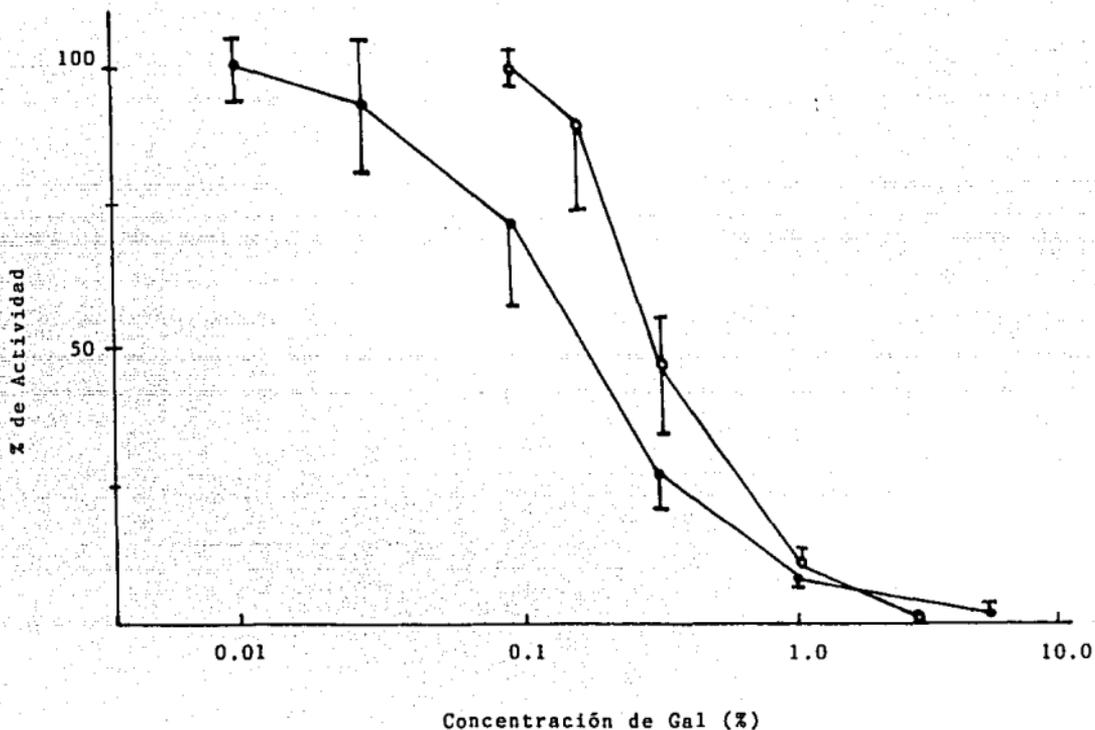
II. Receptor Principal de la Fagocitosis

Tanto la fagocitosis como la muerte celular por amibas aumentaron cuando se incrementó el contacto entre la amiba y el MPr por medio de la centrifugación (Tabla VI). Esto correlaciona con las pruebas de que dichas interacciones dependen de receptores específicos sobre la superficie de la amiba que - - unen sólidamente ligados superficiales de la célula blanco -- (secciones 1.3.I-III). Estudios preeliminares sugieren que la fagocitosis amibiana depende de la lectina Gal/GalNac: 1) tan to la fagocitosis (Orozco et al. 1982a, 1988, Rodríguez y Orozco 1986, Vargas et al. 1990) como la lectina Gal/GalNac (Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1988b, Petri y Ravdin 1987, Gitler y Mirelman 1986) correlacionan con la virulencia amibiana. 2) - En coincubaciones de amiba-célula CHO, el monosacárido GalNac (4%) inhibió 50% la fagocitosis amibiana (Ravdin y Guerrant -- 1981). 3) La ingestión amibiana de mucinas purificadas de colon de rata, depende de su previa adhesión a la superficie mediada por la lectina Gal/GalNac (Chadee et al. 1988). Los resultados de las coincubaciones en presencia de Gal, demuestran que el receptor específico principal de la fagocitosis en E. - histolytica es la lectina Gal/GalNac descrita por Ravdin (Ravdin y Guerrant 1981, Ravdin et al. 1988a, 1989b, Ravdin 1988b, 1989a, Chadee et al. 1988, Petri y Ravdin 1987, Gitler y Mirelman 1986), ya que bajo las mismas condiciones experimentales - utilizadas por Ravdin (Ravdin y Guerrant 1981), Gal (4%), que se une específicamente a dicha lectina (Ravdin y Guerrant 1981, Ravdin et al. 1988a, 1989b, Ravdin 1988b, 1989b, Petri y Ravdin

1987)- inhibió totalmente la macrofagocitosis (Tabla IX y Fig. 12). La presencia continua de Gal se requirió para ejercer la inhibición, ya que el lavado, del MPR o de las amibas pretrata das con Gal (≥ 30 min), en medio fresco sin el carbohidrato -- abrogó completamente su efecto inhibitorio (Tabla X). Este he cho sugiere que la lectina Gal/GalNac es continuamente endoci- tada y reciclada, y que de esta manera la superficie amibiana se limpia de moléculas de Gal; lo que ubica a dicha lectina co mo un receptor adecuado para la fagocitosis amibiana, pues en- docitosis y reciclaje son procesos celulares que corresponden y se esperan de cualquier receptor de fagocitosis. Además, -- Gal (4%) inhibió en un alto grado la fagocitosis de eritrocii- tos de rata en una relación de 300 eritrocitos/amiba (datos no mostrados); y Gal 45 mM inhibió el 50% de la eritrofagocitosis amibiana (I. Montfort, comunicación personal).

Más aún, la inhibición de la fagocitosis de E. Histolytica a lo largo de diferentes concentraciones de Gal fue de mane ra saturable y curvilinear, lo que implica competencia de las moléculas de Gal por sitios de unión sobre la amiba, que ejer- cen de esta manera una inhibición de la fagocitosis por medio de la disminución de la unión molecular entre la amiba y el -- blanco (Fig. 13 A). Este resultado demuestra que el proceso - de fagocitosis en E. histolytica está mediado por un sistema - de receptores que une específicamente residuos de Gal. Un es- tudio anterior muestra que la inhibición de la adherencia de - E. Histolytica por medio de varias concentraciones de Gal re- sulta en una curva de competencia inhibitoria similar (Ravdin y Guerrant 1981), lo que confirma que ambos procesos en E. his- tolytica están mediados por la lectina Gal/GalNac (Fig. 14). - La fagocitosis, en comparación con la adherencia, comienza a - ser sensible al efecto del carbohidrato a partir de una concen- tración diez veces mayor; esto probablemente se debe a que a - 37°C la movilidad de las lectinas incrementa la adherencia (Ed- man et al. 1987, Long Krug y Ravdin 1988), y el elevado recam-

FIGURA 14



Efecto del pegado molecular sobre la adherencia y la fagocitosis de *E. histolytica*. (●) Adherencia: sistema HM1:IMSS-célula CHO, relación 1:20, coincubaciones en paquete en medio TYI a 4°C por 2 hr (Ravdin y Guerrant 1981). (○) Fagocitosis: sistema HM1:IMSS-MPr, relación 1:50, coincubaciones en paquete en medio TYI a 37°C por 2 hr (de la Fig. 13 A).

bio membranal de la amiba le permite eliminar partículas adheridas y reexponer sus antígenos superficiales (Gitler y Mirelman 1986). No obstante, a partir de Gal (0.10%), la caída de la fagocitosis comienza a igualar a la caída de la adherencia, posiblemente debido a que el sistema se va saturando, hasta -- llegar a la inhibición total a 4% de Gal, concentración menor, inclusive, que la necesaria (6%) para inhibir la adherencia -- (Fig. 14).

Aunque todavía no se ha probado el efecto de los anticuerpos monoclonales, dirigidos contra la lectina Gal/GalNac sobre la fagocitosis, el hecho de que sólo existe una especie molecular específica para Gal o GalNac (Petri y Ravdin 1987, Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1989a) indica que fue esta lectina la -- afectada por Gal en los procesos de adherencia y fagocitosis -- en E. histolytica (Fig. 14). En otras palabras, la fagocitosis y la adherencia amibianas dependen principalmente del mismo sistema saturable de receptores específicos para Gal. Esto implica, que la fagocitosis en E. histolytica depende de la -- previa adhesión de las células blanco a la amiba a través del pegado molecular mediado por la lectina Gal/GalNac. Otras -- adhesinas podrían intervenir parcialmente en la fagocitosis de manera específica o inespecífica (Orozco et al. 1982b y c, --- Arroyo y Orozco 1987, Rosales-Encina et al. 1987, Meza et al. 1987, Vargas et al. 1990). La inhibición parcial de Glc (4%) sobre la macrofagocitosis en E. histolytica (Tabla IX), aunque no fue significativa, sugiere que una lectina GlcNac podría de -- sempear un papel secundario en este proceso, lo que se ve apo -- yado por observaciones previas (Orozco et al. 1982b y c, Rosales-Encina et al. 1987, Meza et al. 1987).

III. Diferencias con Otros Sistemas

En un estudio previo, la inhibición de la lectina Gal/GalNac por una concentración de 4% de GalNac no abrogó completa--

mente la fagocitosis de células CHO por las amibas (Ravdin y Guerrant 1981).

¿Por qué en este estudio sí se obtuvo una inhibición total de la capacidad fagocítica de E. histolytica? 1) La Tabla X indica que se requiere la presencia continua de Gal en el medio para observar una inhibición en la macrofagocitosis. Esto se debe muy probablemente a que la E. histolytica presenta una tasa de recambio membranal extremadamente elevada: internaliza toda su membrana superficial cada 20 minutos, lo que le permite deshacerse rápidamente de cualquier ligando y reexponer sus antígenos superficiales (Gitler y Mirelman 1986). Dado este fenómeno, podría ser que la internalización de GalNac (4%) mediada por las amibas fuera más rápida que la internalización de Gal (4%), lo que les permitiría a las amibas deshacerse de una mayor cantidad de GalNac que de Gal durante el mismo periodo, y por tanto, lograr fagocitar más células en presencia del primer carbohidrato (Ravdin y Guerrant 1981). 2) Aunque la unidad de lactosamina (Gal/GalNac) de carbohidratos N-unidos es el receptor de la lectina Gal/GalNac, ésta es más afín por el residuo Gal (Ravdin et al. 1988a, 1989b). Esto se ve apoyado por el hecho de que para las concentraciones mayores a 1%, Gal inhibe más eficientemente el pegado de la amiba a las células CHO que GalNac (Ravdin y Guerrant 1981). En consecuencia, es probable que, a pesar de que se utilizó la misma concentración de monosacárido en el medio, Gal haya inhibido más eficientemente la fagocitosis amibiana que GalNac (Ravdin y Guerrant 1981). 3) Las diferencias en los niveles de glucoproteínas, glucanos glucoesfingolipídicos (responsables del pegado a la E. histolytica, Bialek et al. 1990), y de fosfolípidos negativos (que intervienen en la inducción de la señal transmembranal que activa la polimerización de actina amibiana, Bialek et al. 1990) en las membranas de distintos tipos de célula blanco, seguramente propician diferencias en las tasas de fagocitosis, lo que contribuiría directamente a obtener distintos grados de

inhibición para diversos tipos de célula blanco bajo la misma cantidad de carbohidrato.

IV. Fagocitosis y Virulencia

¿La fagocitosis correlaciona con la virulencia ambiana? Orozco et al. demostraron definitivamente que la fagocitosis es un proceso celular que forma parte de la virulencia ambiana (Orozco et al. 1982a, Rodríguez y Orozco 1986, Orozco et al. 1988, Vargas et al. 1990). Más aún, las cepas no-patogénicas de E. histolytica derivadas de acarreadores asintomáticos, presentan una tasa de fagocitosis significativamente disminuida con respecto a las cepas virulentas (Trissl et al. 1978, Vargas 1990). No obstante, Orozco et al. sólo aislaron casos particulares de amibas deficientes en fagocitosis que mostraron disminuciones en su virulencia; y, debido a la naturaleza del método empleado, en el que sólo sobreviven las amibas que no fagocitan bacterias letales (Orozco et al. 1982a, Rodríguez y Orozco 1986, Orozco et al. 1988), no se aislaron amibas que sí fagocitan pero son deficientes en virulencia. La Tabla VII muestra claramente que estas últimas conforman la mayoría en este estudio, ya que a nivel de población general, no hubo diferencia significativa entre la tasa de fagocitosis de E. histolytica AH virulenta (medida por la capacidad de producir abscesos hepáticos en hamster) y No-AH no virulenta. Más aún, no se ha encontrado diferencia en la eritrofagocitosis de cepas de E. histolytica AH y No-AH, medida a los 15, 30 y 60 min (I. Montfort y A. Reyes, comunicación personal). Tanto en los experimentos de Orozco como en éstos, la cepa no-virulenta de E. histolytica proviene de una virulenta: HMI-IMSS; nuestra cepa no-virulenta adquiere este carácter por un cultivo prolongado. Por lo tanto, se deduce que la amiba virulenta no pierde necesariamente su capacidad de fagocitar, pero sí puede llegar a perder la virulencia debido seguramente a la pérdida de factores adicionales además de la fagocitosis (sección 1.5.II), ya que ésta no es

suficiente por sí sola para producir abscesos. Estos factores incluyen probablemente a las tiolproteinasas amibianas, - responsables de la necrosis tisular en amibiasis experimental (Becker et al. 1988).

Sin embargo, el grado de fagocitosis de E. histolytica - parece ser una característica única de esta especie amibiana: E. invadens siempre presentó una tasa de macrofagocitosis menor que E. histolytica, tanto en coincubaciones en suspensión como en coincubaciones en paquete (Tablas VI, VII, IX y Fig. 11), y la diferencia fue significativa para esta última técnica (Tabla VII). En apoyo a esto, E. invadens y otros tipos de Entamoeba no patógenas para mamíferos muestran una tasa de eritrofagocitosis significativamente menor que la de E. histolytica (Trissl et al. 1978). La fagocitosis de E. invadens - no fue significativamente mayor que la muerte celular de todos los tipos amibianos (Tabla VII), lo que denota su bajo nivel, ya que la muerte celular podría considerarse nula o equivalente a la muerte natural de los macrófagos incubados sin amibas (Fig. II y Tabla VII). Sin embargo, la fagocitosis experimental de E. invadens fue significativamente mayor que la desaparición de los macrófagos incubados solos (Fig. 11). Este bajo pero significativo nivel de fagocitosis fue sensible a Glc (Tabla IX), pero fue mediado por un mecanismo de unión inespecífico a este carbohidrato, dada la proporcionalidad directa en la curva de inhibición de fagocitosis por competencia de unión con Glc (Fig. 13 B). La baja tasa de fagocitosis en E. invadens, correlaciona con la presumible ausencia de algún receptor Glc/GlcNac específico (Fig. 13 B), y de la lectina Gal/GalNac -ya que Gal (4%) no inhibió significativamente la macrofagocitosis (Tabla IX). Esto último es a su vez una prueba de que la cantidad de lectina Gal/GalNac presente en la amibas no solo correlaciona con la virulencia de distintas cepas (Ravdin et al. 1988a, Gitler y Mirelman 1986, Petri y Ravdin 1987, sección 1.3.I), sino de distintos tipos de Entamoeba.

En conclusión, la capacidad de fagocitar células de mamíferos es uno de los factores de la virulencia de E. histolytica y está mediada por la lectina Gal/GalNac, la cual no parece expresarse en E. invadens. La afinidad inespecífica de E. invadens por los residuos de Glc, le permite fagocitar células MPr, pero a niveles más bajos que los de E. histolytica. Esto sugiere que la especificidad de la adherencia desempeña un papel importante en la especificidad del huésped, lo cual ya ha sido propuesto (Ravdin 1988b).

4.3 Receptocinesis

I. Teoría Acerca de un Mecanismo de Muerte Celular

La Teoría de la Receptocinesis, basada en estudios con E. histolytica, se fundamenta en dos postulados:

1) Las pruebas experimentales muestran que, además de la citólisis letal (sección 1.3.II y VIII), la adherencia y la fagocitosis en E. histolytica dependen: a) del mismo receptor específico: la lectina Gal/GalNac (Tabla IX, Fig. 12, Ravdin y Guerrant 1981, Ravdin et al. 1988a, 1989b, Ravdin 1988b, -- 1989a, Gitler y Mirelman 1986, Petri y Ravdin 1987, secciones 1.3.I-III y 4.2.II); b) del sistema de microfilamentos de actina (Ravdin y Guerrant 1981, Ravdin 1988b, Petri y Ravdin -- 1987, Edman et al. 1987, Long-Krug y Ravdin 1988b, Orozco et al. 1988, Bialek et al. 1990, secciones 1.3.I-III); c) de que las amibas estén enteras y vivas (McCaul et al. 1977, Ravdin et al. 1980, Martínez-Palomo 1982); y, finalmente, d) de que se establezca un contacto firme y directo (Tabla VI, Ravdin et al. 1980, Ravdin y Guerrant 1981, Martínez-Palomo 1982, Petri y Ravdin 1987). Lo anterior sugiere que la adherencia, la fagocitosis y la citólisis letal en E. histolytica, están mediadas por un mismo mecanismo molecular que depende directamente de los elementos mencionados.

2) La movilidad de los receptores superficiales depende directamente de la función de los microfilamentos, que se halla involucrada en la unión a receptores superficiales, en el recambio membranal y en el movimiento pseudopodial: la asociación de microfilamentos con complejos ligando-receptor ya ha sido demostrada (Martínez-Palomo 1982, Orozco et al. 1988, -- Long-Krug y Ravdin 1988b); la función de los microfilamentos es responsable del movimiento pseudopodial (Alberts et al. -- 1983, Edman et al. 1987), de la aceleración y reagrupación de antígenos superficiales (Gitler y Mirelman 1986, Edman et al. 1987, Orozco et al. 1988), y de procesos como motilidad, adhesión y recambio membranal: endocitosis y exocitosis (Petri y Ravdin 1987, Edman et al. 1987, Orozco et al. 1988, Bialek et al. 1990). El recambio membranal elevado observado en E. histolytica es el principal responsable de su alto índice fagocítico, y propicia la presencia de proteínas superficiales en la fracción intracelular y viceversa (Gitler y Mirelman 1986).

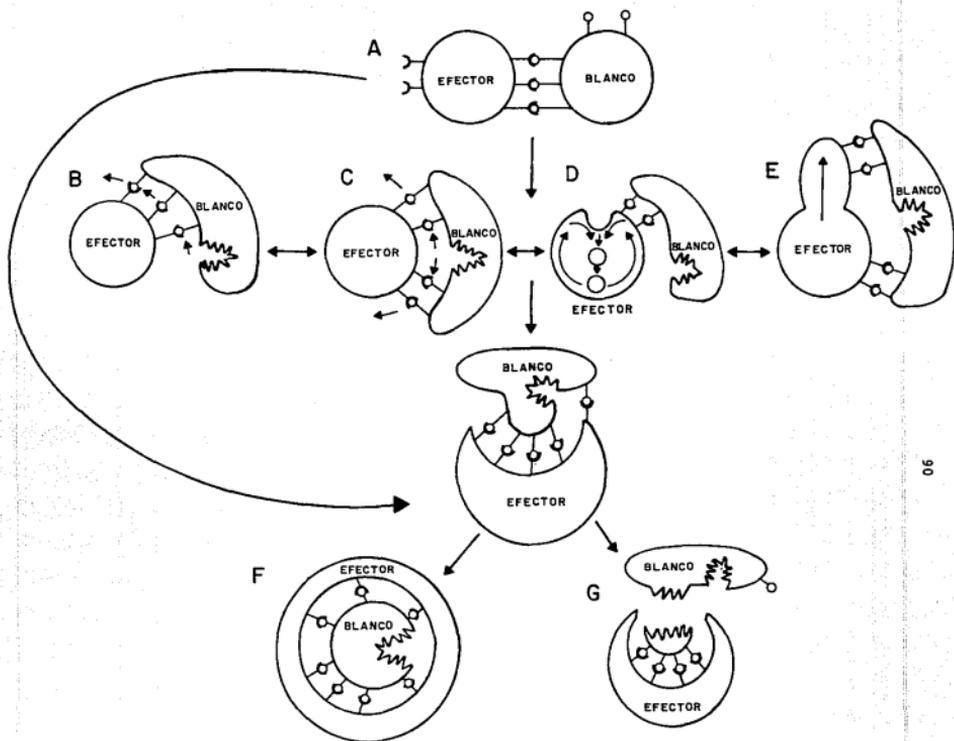
De los dos postulados anteriores, se dedujo que el mismo movimiento de complejos receptor-ligando, que interviene integralmente en los procesos de adherencia y fagocitosis, es el que conforma el proceso de citólisis letal en los organismos celulares que matan por contacto directo. A este mecanismo mecánico se le llamó Receptocinesis, que, como su nombre lo especifica, se refiere a la movilidad de receptores superficiales ejercida a través de la activación del sistema de microfilamentos.

Encontramos a la Receptocinesis durante la adherencia celular, la cual no sólo depende de receptores aislados, sino de la disposición tridimensional que éstos adquieren sobre la superficie de la célula efectora debido a la función de los microfilamentos (Edman et al. 1987, Long-Krug y Ravdin 1988b). Asimismo durante la fagocitosis, la célula efectora redistribuye a las células blanco adheridas a su membrana por medio -

del movimiento de receptores activados por la función de los microfilamentos (Orozco et al. 1988). Pero, ¿de qué manera las células son lisadas y muertas por medio de la Recepto cinesis?

Este proceso citolítico letal sería de tipo mecánico; -- una vez establecidos el contacto firme y la formación de complejos ligando-receptor, que permite la adherencia, la célula efectora mataría a la célula blanco al acelerar y fagocitar -- rápida- y continuamente los complejos receptor-ligando superficiales, lisando y fagocitando al mismo tiempo áreas particu lares de la membrana de la célula blanco (Fig. 15), y subse-- cuentemente matándola debido al cambio osmótico y pérdida de integridad generados por la libre difución de agua, iones y -- otras moléculas según sus gradientes de concentración (Martínez-Palomo 1982, Gitler y Mirelman 1986, Long-Krug y Ravdin - 1988b). Un primer ciclo de daños ocurriría a nivel de la ace leración de los receptores superficiales, lo que generaría -- fuertes tensiones sobre la membrana del blanco y la lisaría -- rápidamente. Esta aceleración receptocinética podría ser pro movida por cualquiera de los tres tipos de manifestaciones de la función de los microfilamentos (Ravdin y Guerrant 1981, -- Ravdin 1988b, Alberts et al. 1983, Gitler y Mirelman 1986, Pe tri y Ravdin 1987, Orozco et al. 1988, Long-Krug y Ravdin - - 1988b, Bialek et al. 1990): 1) directamente, a través de la - activación del sistema de microfilamentos unido con antígenos superficiales, la célula efectora podría movilizar rápidamen te sus receptores hacia una dirección jalando áreas de la mem brana plasmática de la célula blanco y formando así fuertes - tensiones que la lisarían. También podría haber movilización de los receptores en direcciones opuestas, lo que formaría -- otro tipo de tensiones que podrían romper la membrana del - - blanco (Fig. 15B y C). En este tipo de lisis, la muerte del blanco ocurriría antes de ser este fagocitado, posiblemente - durante el proceso de redistribución de ligandos. 2) Indirec

FIGURA 15



El modelo receptocinético de la muerte celular. Antes de que cualquier interacción ocurra, debe lograrse la adherencia entre la célula efectora (E. histocítica en este caso) y la célula blanco por medio de la — formación de complejos receptor efector-ligando blanco (A). Una vez que se establece un contacto directo entre las células interactuantes, el efector acelera los complejos a través de la activación del sistema de los microfilamentos, el cual promueve la movilidad de los receptores de manera directa, en una dirección (B) y en direcciones opuestas (C), o de manera indirecta, por su intervención en el reciclaje membranoso (D) y en los movimientos pseudopodiales (E). Un primer ciclo de daños al blanco podría darse en este estado, debido a las fuertes tensiones propiciadas sobre su membrana por los movimientos rápidos de los receptores. En un segundo ciclo de daños, la fagocitosis del blanco podría completarse (F), o bien podría seguir la fagocitosis parcial de áreas particulares de la membrana del blanco al que lisa nuevamente y finalmente libera (G). El daño membranoso alcanzado como resultado de cualquiera de los dos ciclos finales mataría al blanco debido al cambio osmótico generado. El efector puede pasar directamente al segundo ciclo de daños según la resistencia de la membrana del blanco y/o del número de complejos de unión.

tamente, el sistema de microfilamentos estimularía la aceleración al tomar parte en el reciclaje de la membrana el cual incluye a la pinocitosis, exocitosis, endocitosis y fagocitosis (Long-Krug, Ravdin 1988b). (Fig. 15D). 3) La disociación de los microfilamentos puede también causar fuertes corrientes citoplasmáticas que generan movimientos pseudopodiales rápidos y vigorosos (Alberts et al. 1983); indirectamente, estos últimos podrían llegar a movilizar bruscamente y en direcciones opuestas a los receptores superficiales anclados al citoesqueleto, lo que causaría desgajamientos repentinos en las membranas de las células blanco (Fig. 15E). En un segundo nivel de daño, la célula efectora podría fagocitar completamente a la célula blanco (Fig. 15F), o fagocitarla de manera parcial, al endocitar una porción determinada de su membrana para finalmente liberarla dañada (Fig. 15G).

La fuente motora principal de la Receptocinesis, basada en la función de los microfilamentos, varía seguramente según el tipo celular, por ejemplo: en fagocitos, como amibas y macrofagos, el proceso principal bien pudiera ser el elevado recambio membranal, merced al cual poseen un alto índice fagocítico, o el movimiento pseudopodial; en cambio, la manifestación primordial en células netamente citotóxicas, como linfocitos T8, células NK, pudiera ser la activación del sistema de microfilamentos unido a los antígenos superficiales. Independientemente del proceso motriz, la Receptocinesis sería un mecanismo primitivo que fue seleccionado en algún momento dentro de la evolución de los organismos eucarióticos por las obvias ventajas de conferir al mismo tiempo capacidad móvil, adhesiva, fagocítica y defensiva.

En términos de la teoría de Receptocinesis, las tasas de adherencia, citólisis y fagocitosis en un mismo sistema célula efectora-célula blanco, dependen proporcionalmente de la concentración de ligandos de adhesión y activadores de la fun

ción de los microfilamentos en la célula blanco, y de la concentración de los receptores de adhesión y receptores para activador de la función de los microfilamentos en la célula - - efectora.

Un organismo efector altamente fagocítico (como amibas o macrófagos), podrá lisar células mediante Receptocinesis si - presenta una elevada actividad en su función de los microfila - mentos dada la gran movilidad de receptores superficiales re - querida para propiciar tensiones y rompimientos membranales. - En cambio, para fagocitar estas mismas células, el organismo requiere probablemente de un grado de Receptocinesis menor, - ya que la fagocitosis puede prescindir de tensiones membrana - les fuertes (Fig. 15). La fagocitosis podría requerir del -- mismo grado de Receptocinesis que la citólisis pero nunca ma - yor, ya que mientras haya más movimientos de receptores más - aumenta la probabilidad de que se formen puntos de tensión y de que haya lisis concomitante. Por lo tanto, la fagocitosis precisa de una cantidad de receptores para activar la función de los microfilamentos de igual o menor nivel que la citóli - sis. De manera análoga, la cantidad de receptores de adhe - sión en la célula efectora fagocítica necesarios para iniciar la fagocitosis es igual o menor que para iniciar la citólisis.

Al aplicar el mismo análisis, un mismo tipo de célula - - efectora que presente Receptocinesis y capacidad fagocítica - en grado considerable, podrá fagocitar sin lisar según el ti - po de célula blanco: una célula podrá ser fagocitada si posee una cantidad de ligandos y activadores sobre su superficie - - igual o menor que la necesaria para ser lisada.

Esta diferencia en los inicios de fagocitosis y citóli - -

sis significa que en un mismo sistema célula efectora fagocítica-célula blanco, mientras las condiciones se mantengan - - constantes, lo más probable es que ocurra el primer proceso - con mayor frecuencia que el segundo. Sin embargo, puede ocurrir que el efector presente una capacidad fagocítica menor - que la lítica a pesar de presentar Receptocinesis -células ne tamente citolíticas (como linfocitos T-citotóxicos)- o bien - que las células efectoras sean demasiado pequeñas comparadas con las blanco. También se puede pensar en células blanco ex tremadamente lábiles de las que ciertos efectores desprenden fácilmente fragmentos celulares para luego ser fagocitados és tos en lugar de las células enteras. En estos casos es más - probable que ocurra el proceso de lisis con mayor frecuencia que el de fagocitosis.

La adherencia a la célula efectora no precisa de Recepto cinesis para ser ejercida, por lo tanto siempre hay células - adheridas que no están sujetas a la función de los microfila men tos, o que requieren de una formación menor de complejos - receptor-ligando para adherirse que la requerida para la citó l lisis o la fagocitosis. Como la adherencia es el paso crítico y primario para la fagocitosis y citólisis por contacto, - las células adheridas más las células fagocitadas y las lisadas conforman el total de células que se adhirieron. En consecuencia, aunque la adherencia no es medible con exactitud a partir de los 4°C (debido a que la fagocitosis y la citólisis eliminan células adheridas), lo anterior indica que para un - sistema célula efectora-célula blanco determinado, en cual- - quier momento hubo más células que se adhirieron que células fagocitadas o lisadas. Asimismo, como la adherencia prescind de de la función de los microfilamentos, los tres procesos de

penden primordialmente de la concentración de ligando de adhesión y receptor de adhesión para la formación de los complejos receptor-ligando. Por lo tanto, cualquier factor que afecte esta formación afectará a los tres procesos en conjunto, aunque la adherencia generalmente en menor grado ya que ésta suele ser mayor en cualquier momento.

Debido a que la Receptocinesis media los procesos celulares agresivos (citólisis y fagocitosis) de toda una especie o estirpe celular, se postula que los receptores que intervienen en este mecanismo son receptores máximos, definidos como receptores que: 1) son generales, o sea que se encuentran en todas las cepas virulentas -por lo menos- de la especie, sin ser específicos según el tipo celular; 2) intervienen en la adhesión, citólisis y fagocitosis más que cualquier otro receptor general; 3) correlacionan con virulencia o carácter agresivo. Pero además de receptores máximos, podrían intervenir diferencialmente uno o más tipos de receptores con distintas afinidades para ligando y/o especificidades de subtipo celular, actuando sinérgicamente con los primeros.

El papel del calcio en la Receptocinesis es de fundamental importancia. La función de los microfilamentos depende del calcio. El Ca^{++} es necesario para estabilizar la conformación globular de la actina (Alberts et al. 1983). Además, un aumento en la concentración de Ca^{++} intracelular en células no musculares y protozoarios, disocia redes de actina y activa moléculas de miosina, capaces estas últimas de contraer microfilamentos a través de fosforilasas específicas, lo cual origina corrientes citoplasmáticas y movimientos de los microfilamentos respectivamente (Alberts et al. 1983).

II. Validez de la Teoría

La Teoría de Receptocinesis explica lógica- y satisfactoriamente los requisitos referidos al mecanismo citolítico letal de E. histolytica expuestos en la sección 1.3.VIII:

a) La unidireccionalidad amibiana (Petri y Ravdin 1987): la Receptocinesis no implica ningún mecanismo de toxinas que requiera ser resistido por la amiba. Además, explica la necesidad de contacto en este tipo de muerte celular, y la razón por la que las células blanco que no están en contacto directo con las amibas permanecen viables aunque se encuentren extremadamente cerca respecto a la célula efectora o respecto a otra célula blanco que sí esté en contacto con la efectora -- (Ravdin et al. 1980, Ravdin 1989a, Petri y Ravdin 1987). Basta con que la célula efectora no posea una cantidad excesiva de ligandos específicos para sus propios receptores, y podrá evitar la autólisis y la autofagocitosis; de esta manera, éste constituye un probable sistema de reconocimiento entre lo propio y lo no-propio, aplicable posiblemente a otros organismos celulares.

b) El efecto de "pegar y correr" observado (Petri y Ravdin 1987): la lisis de células blanco según la Receptocinesis no es necesariamente continua; si la amiba y la célula blanco establecen un solo punto de contacto, en el cual los receptores se movilizan rápidamente y luego son endocitados, -- llevándose consigo las áreas de la membrana plasmática que -- conformaban la unión, ésta se pierde, la célula blanco resul-

ta dañada, y la amiba queda libre para interactuar con otras células. El efecto es el mismo en el caso de haber más puntos de unión que se pierdan repentinamente y en forma simultánea por el proceso señalado (Fig. 15F y G).

c) La velocidad extrema del "golpe mortal" amibiano recibido por la célula blanco, tan sólo segundos o minutos después del contacto mediado por la lectina Gal/GalNac (Ravdin et al. 1980, Ravdin 1989a, Martínez-Palomo 1982, Petri y Ravdin 1987), el cual es demasiado rápido como para poder ser mediado únicamente a través de la acción de las citotoxinas amibianas. La misma elevada velocidad de recambio membranaral, -- que impide a una citotoxina superficial hipotética tener la permanencia suficiente en el sitio de acción, es en la Receptocinesis la que promueve rápidamente múltiples tensiones -- fuertes en la membrana plasmática. Además, la probabilidad de que ocurra un rompimiento considerable de la membrana plasmática, según la Receptocinesis, es bastante elevada, dada la extensión tan vasta --referida al área de contacto entre amiba y célula blanco-- donde podrían formarse en cualquier momento puntos de tensión; esto asegura un daño rápido en el blanco -- de acuerdo a los tiempos observados.

d) Los efectos en las células blanco resultantes de un cambio osmótico, luego de haberse establecido el contacto con la amiba (McCaul et al. 1977, Ravdin et al. 1980, Martínez-Palomo 1982, Gitler y Mirelman 1986): la ruptura repentina de la membrana celular aumenta la permeabilidad de ésta al agua y iones, y les permite difundir según sus gradientes de concentración. El aumento intracelular de ciertos iones, princi

palmente calcio, se considera la causa de cascadas bioquímicas que destruyen a la célula blanco (Martínez-Palomo 1982, - Gitler y Mirelman 1986, Long Krug y Ravdin 1988b).

e) La razón por la cual la citólisis amibiana es independiente de la motilidad (Ravdin et al. 1980, Petri y Ravdin -- 1987): la Receptocinesis propone a la activación del sistema de microfilamentos unido a los antígenos superficiales y/o al recambio membranal, como alternativas a la motilidad del parásito para producir el movimiento de complejos receptor-ligando que rompe la membrana del blanco.

f) La razón por la cual la fagocitosis amibiana es independiente de la citólisis y ocurre después de ésta (Ravdin et al. 1980) o en su ausencia (Ravdin y Guerrant 1981): con base en lo establecido por el mecanismo de Receptocinesis para -- efectores fagocíticos, si existe un número suficiente de uniones entre el blanco y el efector los efectos amibianos serán adherencia, citólisis y fagocitosis en ese orden; si no hay -- bastantes sitios de unión, por el tipo de células interactuantes o por estar obstruidos con algún reactivo, únicamente ocurre adherencia y fagocitosis debido a que el proceso de fagocitosis no requiere de tensiones membranales tan elevadas como el de citólisis (Fig. 15). Dada la alta afinidad de la -- lectina Gal/GalNac por residuos de GalNac (Ravdin y Guerrant 1981, Ravdin 1989a, Ravdin et al. 1989b), un decremento en el número de uniones entre célula CHO y amiba en efecto ocurre -- cuando GalNac se adiciona al medio de incubación (Ravdin y -- Guerrant 1981). De aquí que una cantidad menor de ligandos -- para la lectina Gal/GalNac en el MPR comparado con la célula

CHO, puede ser la causa de la ausencia de muerte de células - MPr por amibas (Fig. 11), a diferencia de lo que sucede con - las células CHO (Ravdin et al. 1980, Ravdin y Guerrant 1981).

III. Pruebas de la Teoría de Receptocinesis

Existen varias pruebas que apoyan claramente la existencia de Receptocinesis en E. histolytica:

1) Los trofozoitos mutantes de E. histolytica que carecen de la lectina Gal/GalNac, presentan deficiencia en los tres procesos celulares: adherencia, citólisis letal y fagocitosis de células blanco (Rodríguez y Orozco 1986, Petri y Ravdin 1987, Ravdin et al. 1988a).

2) E. histolytica presenta una función de los microfilamentos extremadamente elevada (Alberts et al. 1983, Huber et al. 1987, Edman et al. 1987, Bialek et al. 1990, Long-Krug y Ravdin 1988b). Esto demuestra que la amiba tiene el sistema de fuerza motriz necesario para expresar la citólisis letal - por Receptocinesis.

3) Los estudios de adherencia, citólisis y fagocitosis - hechos con el sistema amiba-célula CHO (Ravdin et al. 1980, - Ravdin y Guerrant 1981), así como los estudios acerca del sistema de microfilamentos de E. histolytica (Bialek et al. 1990), demuestran que: a) el aumento del efecto citolítico y fagocítico es proporcional al nivel de receptores superficiales amebicos o de ligando en el blanco; b) en ausencia de un número elevado de uniones entre el blanco y el efector, la amiba puede fagocitar sin que ocurra lisis, c) el incremento en el nivel de la función de los microfilamentos propicia un aumento en el efecto citofagocítico; d) una función de los microfilamentos elevada es esencial para la citólisis, pero no para la fagocitosis; e) el incremento en la activación de los microfili

lamentos -y por ende en la tasa de citólisis y fagocitosis- es proporcional al aumento en la concentración del activador de la función de los microfilamentos en la célula blanco (fosfolípidos negativos).

4) Con microscopía electrónica de transmisión se observó que por medio de acción mecánica las amibas son capaces de -- arrancar porciones de las membranas de las células blanco, -- formando ampollas citoplásmicas y lisando a las células dañadas. Además, las células pueden ser arrancadas del sustrato por trofozoitos en movimiento, y ser fagocitadas en varios estadios de lisis (Martínez-Palomo 1982, Petri y Ravdin 1987). Este tipo de despegado celular podría llegar a ser el más común, ya que, aunque las tiolproteinasas amibianas liberan células del sustrato (Lushabug 1988b, Luaces y Barret 1988), -- los inhibidores de éstas no inhiben el arrancamiento de las células MDCK por trofozoitos (I. Montfort, comunicación personal). Lo anterior demuestra la existencia y el orden de interacción mecánica entre la amiba y la célula blanco de acuerdo a lo estipulado por la Teoría de Receptocinesis.

IV. Receptocinesis como Mecanismo General

Existen pruebas de que un mecanismo de Receptocinesis se presenta en otros sistemas celulares, por ejemplo: se ha visto bajo microscopía electrónica que los macrófagos y los linfocitos T son capaces de arrancar porciones superficiales de las células blanco (Martínez-Palomo 1982), el efecto citolítico de ambos requiere que las células efectoras estén vivas y de un contacto directo con la célula blanco (Ravdin et al. 1980, Salata et al. 1985, 1987). Es interesante que los macrófagos, al igual que las amibas, presentan un recambio membranal elevado (Gitler y Mirelman 1986). Más aún, las citocalasinas -- inhiben la citólisis y la adherencia por macrófagos y linfocitos T al actuar sobre los microfilamentos (Ravdin et al. -- 1980).

En los leucocitos, existen unas moléculas llamadas LFA-1, que median las funciones de adherencia y citólisis inespecífica (Springer et al. 1987). El que los leucocitos presenten un sistema dependiente y otro independiente de antígeno, es muy razonable: mientras que el primero determina la especificidad, el segundo aumenta la eficiencia y velocidad de las interacciones efectoras en general. Las funciones mediadas por LFA-1 cumplen con los requisitos de la Receptocinesis, ya que dependen de la temperatura, función microfilamentosa y Ca^{++} para la citólisis (Springer et al. 1987). Al igual que la lectina Gal/GalNac en E. histolytica (Ravdin 1989a, la LFA-1, junto con las moléculas Mac-1, y p150,95 de granulocitos y monocitos, constituyen una familia de heterodímeros que presentan una subunidad mayor responsable de mediar la adherencia. En los tres casos, la subunidad mayor es variable; sin embargo, la subunidad menor es idéntica, y su función es translocar la primera a la superficie celular (Springer et al. 1987). Esto último sugiere que la subunidad menor (35 Kd) de la lectina Gal/GalNac, se encarga de transportar a la mayor (170 Kd) a la superficie amibiana.

En el caso de leucocitos, se ha encontrado que la molécula LFA-1 se halla localizada junto con microfilamentos en los sitios de adherencia. Más aún, la LFA-1, Mac-1, y p150,95 constituyen una familia supergénica junto con los receptores de matriz extracelular, los cuales, se hallan unidos al citoesqueleto en las placas de adhesión. (Springer et al. 1987). No obstante, la LFA-1 parece ser un receptor distribuido de manera general en leucocitos; mientras que Mac-1 y p150,95 en granulocitos y monocitos, la CD2, moléculas antígeno- y MHC dependientes, principalmente en linfocitos T (Springer et al. 1987), serían receptores secundarios específicos según la estirpe celular.

Los resultados arriba mencionados indican que la adheren

cia, citólisis letal y fagocitosis en leucocitos, dependen de la viabilidad de la células efectoras, del contacto directo, de la función microfilamentosa y de la expresión de receptores específicos. Las pruebas presentadas en las dos últimas secciones, sugieren fuertemente que existe un mecanismo de Receptocinesis para sistemas celulares que exhiben al mismo tiempo adherencia, citólisis letal por contacto y fagocitosis.

V. Activación de la Receptocinesis

En E. histolytica parece existir el sistema transductor de señales que utiliza calcio como segundo mensajero, como mecanismo regulador de varios procesos de agresión amibianos, - particularmente la adherencia, citolisis y fagocitosis (secciones 1.3 y 1.5.IV).

En linfocitos, el sistema de adhesión LFA-1 depende de su activación previa, mediada a través de la proteína cinasa C. Los esteroides de forbol (activadores de la cinasa C), no incrementan la cantidad de LFA-1 superficial ni la síntesis de proteínas, pero sí inducen la formación de pseudópodos, la motilidad, mayor rapidez en el reagrupamiento de ligandos y fosforilación en la subunidad menor de LFA-1 (Springer et al. -- 1987); (esto último sugiere que la subunidad menor de la lectina Gal/GalNac de E. histolytica es susceptible a fosforilaciones, dadas las similitudes entre esta lectina y la molécula LFA-1 expuestas en la sección anterior).

Las observaciones arriba mencionadas sugieren que la Receptocinesis se activa por medio del sistema transductor de señales que incluye la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 -bifosfato que libera inositol trifosfato y diacilglicerol (Long-Krug y Ravdin 1988a-b). Este sistema implica la existencia de receptores que inician el proceso de transducción. Una vez activada la proteína cinasa C por el diacilgli

cerol, los receptores máximos y secundarios sufrirían una fosforilación, y producirían los cambios conformacionales o -- unión al citoesqueleto necesarios para un aumento en la adherencia o para poder ejercer la citólisis y fagocitosis por medio de la Receptocinesis. Mientras tanto, la otra rama del sistema, la liberación de inositol trifosfato, induciría el aumento intracelular de calcio necesario para activar al citoesqueleto y a las funciones que de él dependen. De esta manera, ambas ramas de este sistema transductor son potencialmente capaces de realizar los cambios conformacionales y los movimientos de receptores necesarios para el aumento de la adherencia, citólisis y fagocitosis, lo que aunado a las observaciones previamente discutidas, postula a este sistema transductor como un probable activador de la Receptocinesis.

5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las principales conclusiones del presente trabajo son:

A) La clase catalítica principal, tanto para E. histolytica como para E. invadens, son proteinasas de cisteína, y posiblemente exista un pequeño grupo de proteinasas de serina.

B) Las proteinasas de E. histolytica y E. invadens son cualitativamente distintas entre sí, y posiblemente confieren a la amiba cierto grado de especificidad por su huésped respectivo al propiciar el proceso lítico y desestabilizador de células durante la invasión.

C) Este estudio sugiere que la fagocitosis amibiana podría ser el mecanismo de daño celular principal in vivo.

D) Otros mecanismos de virulencia además de la fagocitosis (Orozco et al. 1982a, 1988, Rodríguez 1986) son necesarios para la producción de abscesos hepáticos en hamster por E. histolytica. Estos incluyen probablemente a las tiolproteinasas amibianas, responsables de la necrosis tisular en amibiasis experimental (Becker et al. 1988).

E) La fagocitosis de E. histolytica es un fenotipo que puede mantenerse por tiempos prolongados en cultivo axénico.

F) La fagocitosis amibiana correlaciona con la virulencia, dado que la tasa de ésta en E. invadens es significativamente menor que en E. histolytica (ambas variantes).

G) La lectina superficial Gal/GalNac, es el receptor - -

principal de la fagocitosis específica en E. histolytica.

H) E. invadens fagocita células MPr por medio de un sistema inespecífico afín para residuos de Glc. Presumiblemente la lectina Gal/GalNac está ausente en este tipo de amiba.

I) La Receptocinesis es un mecanismo posible de citólisis letal aplicable a E. histolytica y a otros organismos que matan células por contacto directo.

E. histolytica presenta, de manera general, cinco mecanismos de agresión que correlacionan con la virulencia:

1) Secreción de tiolproteinasas amibianas- responsables de la destrucción tisular y la inestabilidad de las células del huésped (sección 1.3.IV.).

2) Citólisis- responsable de la muerte celular; ejercida directamente por medio de la Receptocinesis.

3) Fagocitosis- mecanismo responsable de la ingestión de partículas y células del huésped.

4) Adherencia específica- necesaria para el pegado durante la invasión, y para mediar eficientemente la citólisis y fagocitosis a través de la Receptocinesis; ejercida principalmente por la lectina Gal/GalNac, receptor máximo en E. histolytica.

5) Resistencia amibiana- incrementa la supervivencia del parásito frente a la acción de las defensas del huésped (sección 1.3.V).

Todavía queda mucho por aprender acerca de estos cinco mecanismos, sin embargo, a partir de éstos, surgen preguntas aún sin respuesta sobre la virulencia amibiana (sección 1.5. IV.), entre las principales:

a) ¿Existe un único mecanismo regulador para todos los procesos de virulencia mencionados?

b) ¿Es este sistema(s) regulador(es) el o los responsables del cambio de amiba no-virulenta a virulenta, o bien, la expresión de los procesos de agresión amibiana está condicionada a un mecanismo general inductor de virulencia aún no determinado, que posiblemente incluiría cambio a nivel de genoma?

No obstante el mar aún vacío de la investigación básica, el diseño de amebicidas menos tóxicos (Martínez-Palomo 1982) y de vacunas contra la amibiasis no debe hacerse esperar. La investigación aplicada podría enfocarse hacia uno o más de -- los mecanismos de agresión. Con respecto a esto, la lectina Gal/GalNac, además de desempeñar un papel central en la adherencia, citólisis, fagocitosis y receptocinesis de E. histolytica, es universalmente reconocida por sueros inmunes, promueve protección en hamsters, y los anticuerpos contra ésta inhiben la adherencia y la citólisis de esta Entamoeba (Ravdin et al. 1988a, Ravdin 1989a, Petri y Ravdin 1991); por lo tanto, los resultados de este estudio apoyan a esta lectina como un candidato adecuado para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la amibiasis invasiva.

REFERENCIAS

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D., 1983. The Cytoskeleton, en Molecular Biology Of - The Cell (Garland Publishing Inc., 1983) pp. 550-605.
- Arroyo R., Orozco E., 1987. Localization and identification of an Entamoeba histolytica adhesin. Mol Biochem Parasitol 23:151.
- Avila E.E., Sánchez-Garza M., Calderón J., 1985. Entamoeba - histolytica and E. invadens: sulfhydryl dependent proteolytic activity. J. Protozool 32:163.
- Barrett A.J., 1977. Introduction to the history and classification of tissue proteinases, en Proteinases in Mammalian Cells and Tissues, A.J. Barrett ed., (Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1977) pp. 1-55.
- Bhattacharya S., Bhattacharya A., Diamond L., 1988. Comparison of repeated DNA from strains of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Mol Biochem Parasitol 27:257.
- Becker I., Pérez-Tamayo R., Montfort I., Alvizouri A.M., Pérez-Montfort R., 1988. Entamoeba histolytica: role of amebic proteinases and polymorphonuclear leukocytes in acute experimental amebiasis in the rat. Exp Parasitol 67:268.
- Bialek G.B., Gilmour J.R., McCoomer N., 1990. Roles of target cell membrane carbohydrate and lipid in Entamoeba histolytica interaction with mammalian cells. Infect Immun 58:2389.

- Calderón J., 1988. The role of complement in host defense -- against *Entamoeba histolytica*, en *Amebiasis- Human Infection by Entamoeba histolytica*, J.I. Ravdin ed., (John -- Wiley & Sons Inc., 1988) pp. 453-482.
- Castellanos C., Ramos C., Ortiz-Ortiz L., 1989. Effects of - gamma interferon on synthesis of DNA and proteins by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 57-2771.
- Chadee K., Johnson M.L., Orozco E., Petri W.A., Ravdin J.I., 1988. Binding and internalization of rat colonic mucins by the galactose/N-acetyl-D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 158-398.
- De Meester F., Shaw E., Scholze H., Stolarzky T., Mirelman D. 1990. Specific labeling of cysteine proteinases in pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Infect - Immun* 58:1396.
- Denis M., Chadee K., 1988. In vitro and in vivo studies of - macrophage functions in amebiasis. *Infect Immun* 56:3126.
- Diamond L.S. 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* (Schaudin 1903) and *Entamoeba histolytica*-like amoebae. *J Parasitol* 54:1047.
- Diamond L.S., Harlow D.R., Cunnick C.C. 1978. A new medium - for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72:431.
- Diamond L., 1983. Lumen dwelling protozoa: *Entamoeba*, *Trichomonads*, and *Giardia*, en *In Vitro Cultivation of Protozoan Parasites*, J.B. Jensen ed., (CRC Press Inc., 1983)- pp. 65-109.

- Edman U., Meza I., Agabian N. 1987. Genomic and cDNA actin - sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci USA 84:3024.
- Garfinkel L., Giladi M., Huber M., Gitler C., Mirelman D., Revel M., Rozenblatt S. 1989. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. Infect Immun 57:926.
- Gitler C., Mirelman D., 1986. Factors contributing to the pathogenic behavior of *Entamoeba histolytica*. Ann Rev Microbiol 40:237.
- Gold D., 1989. Delayed-type hypersensitivity to *Entamoeba histolytica* in mice and hamsters: a comparison. Parasitol Res 75:335.
- Huber M., Koller B., Gitler C., Mirelman D., Revel M. Rozenblatt Sh., Garfinkel L., 1989. *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular -- DNA molecules. Mol Biochem Parasitol 32:285.
- Kean B.H., 1988. A history of amebiasis, en Amebiasis-Human Infection by *Entamoeba histolytica*, J.I. Ravdin ed., - - (John Wiley & Sons Inc., 1988) pp. 1-12.
- Kretschmer R., Collado M.L., Pacheco M.G., Salinas M.C., Lopez-Osuna M., Lecuona M., Castro E.M., Arellano J.A., -- 1985. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *E. histolytica*, Parasite Immunol 7:527
- Long-Krug S.A., Ravdin J.I., 1988a. The role of amebic phospholipases in cytolysis of target cells by *Entamoeba histolytica*, en Amebiasis-Human Infection by *Entamoeba his-*

- tolytica, J.I. Ravdin ed., (John Wiley & Sons Inc., 1988) pp. 232-250.
- Long-Krug S.A., Ravdin J.I., 1988b. The role of calcium in cytotoxicity of target cells by *Entamoeba histolytica*, en Amebiasis- Human Infection by *Entamoeba histolytica*, J.I. -- Ravdin ed., (John Wiley & Sons Inc., 1988) pp. 251-262.
- Lauces A.L., Barrett A.J., 1988. Affinity purification and - biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* 250:903.
- Lushbaugh W.B., Miller J.H., 1988a. The morphology of *Entamoeba histolytica*, en Amebiasis- Human Infection by *Entamoeba histolytica*, J.I. Ravdin ed., (John Wiley & Sons - Inc., 1988) pp. 41-68.
- Lushbaugh W.B., 1988b. Proteinases of *Entamoeba histolytica*, en Amebiasis- Human Infection by *Entamoeba histolytica*, - J.I. Ravdin ed., (John Wiley & Sons Inc., 1988) pp. 219-231.
- Martínez-Palomo A., 1982. The Biology of *Entamoeba histolytica*, (John Wiley & Sons Ltd., 1982) pp. 1-3, 95-121.
- Martínez-Palomo A., Tsutsumi V., Anaya-Velazquez F., González Robles A., 1989. Ultrastructure of experimental intestinal invasive amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 41:273.
- Mattern C.F.T., Keister D.B., Natovitz P.C., 1982. Virulence of *Entamoeba histolytica* upon continuous axenic cultivation. *Arch Invest Med (Mex)* 13 (Suppl 3): 185.
- McCaul T.F., Poston R.N., Bird R.G., 1977. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*: Chromium release from labeled human liver cells in culture. *Exp Parasitol* 43:342.

- McKerrow J.H., 1989. Parasite Proteases. *Exp Parasitol* 68: 111.
- Meerovitch E., Chadee K., 1988. In vivo models for pathogenicity in amebiasis, en *Amebiasis- Human Infection by Entamoeba histolytica*, J.I. Ravdin ed., (John Wiley & sons - Inc., 1988) pp. 177-190.
- Meza I., Cazares F., Rosales-Encina J.L., Talamás-Rohana P., - Rojkind M., 1987. Use of antibodies to characterize a - 220-kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Infect Dis* 156:798.
- Mogyoros M., Fishelson Z., Gitler C., 1986a. Lysozyme and - complement-dependent lysis of *Entamoeba histolytica*. *Israel J Med Sci* 22:918.
- Mogyoros M., Calef E., Gitler C., 1986b. Virulence of *Entamoeba histolytica* correlates with the capacity to develop complement resistance. *Israel J Med Sci* 22:915.
- Mogyoros M., Calef E., Gitler C., 1989. The role of the plasma membrane in the response of parasites to stress, en -- *New Strategies in Parasitology*, McAdam K.P.W. ed., (Edinburgh, Churchill Livingstone, 1989) pp. 74-94.
- Neal R.A., 1988. Phylogeny: The relationship of *Entamoeba histolytica* to morphologically similar amebae of the - - four-nucleate cyst group, en *Amebiasis- Human Infection by Entamoeba histolytica*, J.I. Ravdin ed., (John Wiley & sons Inc., 1988) pp. 13-26.
- Orozco E., Guarneros G., Martínez Palomo A., 1982a. Clonas - de *E. histolytica* deficientes en fagocitosis presentan - deficiencia en virulencia. *Arch Invest Med (Mex)* 13 - - (Supl 3):137.

- Orozco E., Martínez Palomo A., González Robles A., Guarneros G., Mora Galindo J., 1982b. Las interacciones entre lectina y receptor median la adherencia de *E. histolytica* a células epiteliales. Relación de adhesión con la virulencia de las cepas. Arch Invest Med (Mex) 13 (Supl 3): 159.
- Orozco E., Martínez Palomo A., Guarneros G., Kobiler D., Mirelman D., 1982c. Receptores participantes en la adherencia de *E. histolytica* a eritrocitos humanos. Arch Invest Med (Mex) 13 (Supl 3):177.
- Orozco E., Rodríguez M.A., de la Cruz Hernández F., 1988. The role of phagocytosis in the pathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*, en Amebiasis- Human Infection by *Entamoeba histolytica*, J.I. Ravdin ed., (John Wiley & Sons - Inc., 1988) pp. 326-338.
- Ostoa-Saloma P., Cabrera N., Becker I., Pérez-Montfort R., -- 1989a. Proteinases of *Entamoeba histolytica* associated with different subcellular fractions. Mol Biochem Parasitol 32:133.
- Ostoa-Saloma P.U.G., 1989b. Tesis de maestría en investigación biomédica básica: estudio acerca de las proteinasas de *Entamoeba histolytica*. UACPyP del CCH, U.N.A.M.
- Otte J., Werries E., 1989. Specificity of a cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* against various unblocked synthetic peptides. Mol Biochem Parasitol 33:257.
- Pérez-Montfort R., Ostoa-Saloma P., Velázquez-Medina L., Montfort I., Becker I., 1987. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 26: 87.

- Petri Jr. W.A., Ravdin J.I., 1987. Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: the role of amebic adherence and contact-dependent cytolysis in pathogenesis. *Eur J Epidemiol* 3:123.
- Petri Jr. W.A., Ravdin J.I., 1991. Protection of gerbils - - from amebic liver, abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 59:97.
- Ravdin J. I., Croft B.Y., Guerrant R.L., 1980. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 152:377.
- Ravdin J.I., Guerrant R.L., 1981. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 68:1305.
- Ravdin J.I., Petri W.A., Mirelman D., 1988a. Mechanisms of -- adherence by *Entamoeba histolytica*, en *Amebiasis- Human Infection by Entamoeba histolytica*, J.I. Ravdin ed., - - (John Wiley & Sons Inc., 1988) pp. 205-218.
- Ravdin J.I., 1988b. Pathogenesis of amebiasis: an overview, - en *Amebiasis- Human Infection by Entamoeba histolytica*, - J.I. Ravdin ed., (John Wiley & Sons Inc., 1988) pp. 166-176.
- Ravdin J.I., 1989a. *Entamoeba histolytica*: from adherence to enteropathy. *J Infect Dis* 159:420.
- Ravdin J.I., Stanley P., Murphy C.F., Petri W.A. Jr., 1989b.- Characterization of cell surface carbohydrate receptors for *Entamoeba histolytica* adherence lectin. *Infect Immun* 57:2179.

- Reed Sh.L., Keene W.E., Mckerrow J.H., Gigli I., 1989. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Immunol* 143:189.
- Rodríguez M.A., Orozco E., 1986. Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 154:27.
- Rosales-Encina J.L., Meza I., Lopez-De-Leon 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* 156:790.
- Rosenberg I.M., Bach D., Loew L.M., Gitler C., 1988. Ionophore activity (amebopore) of *Entamoeba histolytica*, en Amebiasis- Human Infection by *Entamoeba histolytica*, J.I. -- Ravdin ed., (John Wiley & Sons Inc., 1988) pp. 273-282.
- Rosenberg I., Bach D., Loew L.M., Gitler C., 1989. Isolation, characterization, and partial purification of a transferable membrane channel (amebapore) produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 33:237.
- Salata R.A., Pearson R.D., Ravdin J.I., 1985. Interaction of human leukocytes and *Entamoeba histolytica*. Killing of - virulent amoeba by the activated macrophage. *J Clin Invest* 76:491.
- Salata R.A., Cox J.G., Ravdin J.I., 1987. The interaction of human T-lymphocytes and *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amoeba by lectin-dependent lymphocytes. *Parasite Immunol* 9:249.

- Scholze H., Werries E., 1984. A weekly acidic protease has a powerful proteolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 11:293.
- Springer T.A., Dustin M.L., Kishimoto T.K., Marlin S.D., 1987. The lymphocyte function associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Ann Rev Immunol* 5:223.
- Trissl D., Martínez-Palomo A., de la Torre M., de la Hoz R., - Pérez de Suárez E., 1978. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J Exp Med* 148:1137.
- Umezawa H., Aoyagi T., 1977. Activities of proteinase inhibitors of microbial origin, en *Proteinases in Mammalian - - Cells and Tissues*, A.J. Barret ed., (Elsevier North Holland Biomedical Press 1977) pp. 637-662.
- Vargas M.A., Isibasi A., Kumate J., Orozco E., 1990. Non-pathogenic *Entamoeba histolytica*: functional and biochemical characterization of a monoxenic strain. *Mol Biochem Parasitol* 40:193.
- Walsh J.A., 1988. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection, y transmission of *Entamoeba histolytica* infection, ambos en Amebiasis- Human Infection by *Entamoeba histolytica*, J.I. Ravdin ed., (John Wiley & Sons Inc., 1988) pp. 93-119.
- Weinbach E.C., 1988. Metabolism of *Entamoeba histolytica*, en Amebiasis- Human Infection by *Entamoeba histolytica*, J. I. Ravdin ed., (John Wiley & Sons Inc., 1988) pp. 69-78.