



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**“CARACTERIZACION DE *Entamoeba histolytica*
MEDIANTE EL ESTUDIO DE ZIMODEMOS Y
COLAGENASA EN AISLADOS DE PACIENTES”**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

EDGAR RANGEL LOPEZ



LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEXICO

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Lab. 52 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, bajo la Co-dirección de las Dras. Mireya de la Garza A. y Lourdes Muñoz M.; con apoyo del CONACyT (No. de registro 61219) como parte del proyecto P228CCOX-891568 financiado por la misma Institución.

Dedicatoria:

A Dios, por brindarme la oportunidad de vivir y apreciar la vida de esta forma

A mis padres: Martha, Luz Ma., Ciro y Domingo por enseñarme el valor del trabajo y las normas que me guían

A mis hermanos H. Hugo y Norma por su comprensión y cercanía

A mis tíos y primos por sus muestras de cariño y alegría

A mi mamá Carmelita y papá Domingo, pilares de mi familia

A Isabel P. R. por hacerme saber que mis anhelos e ideales en la vida encuentran eco en alguien más

A tí, porque recorrimos largo camino y siempre estuviste junto a mí

Gracias

Agradecimientos:

Mi sincero y profundo agradecimiento a la Dra. Mireya de la Garza por la gran calidad humana que la caracteriza en todos sentidos, por su ejemplo cotidiano, apoyo para realizar este trabajo y por darme la oportunidad de conocer e interesarme en la investigación.

Le agradezco a la Dra. Lourdes Muñoz su disposición para expresar comentarios y sugerencias durante la realización del trabajo; así como por el esfuerzo para la revisión y corrección del escrito durante su estancia en el extranjero.

A la M. en C. Claudia García-Cuéllar, a la Biól. Magdalena Reyes, al Biól. Brígido Gallegos y al M. en C. Jesús Serrano por su cordialidad, compañerismo y sugerencias que en todo momento me han demostrado.

Al personal del laboratorio 1 de Genética y Biología Molecular y al personal del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV por las facilidades otorgadas para la realización del trabajo.

A los sinodales de tesis I.B.Q. Abel Fuentes, Q.F.B. Gloria Luz Paniagua, Dr. Victor Rivera y Biól. Ma de los Angeles Sanabria, por la revisión del trabajo escrito y comentarios.

A mis profesores y compañeros de carrera y de equipo cuya compañía e interacción me brindaron grandes satisfacciones y ejemplos a seguir.

Agradezco al Dr. Carlos Argüello del Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV por su confianza y las facilidades otorgadas para la presentación del trabajo.

De manera muy especial, expreso mi agradecimiento a la Biól. Santa Campos Salazar por su amistad plena e incondicional, por su apoyo y orientación que en todo momento he sentido y que han dado nuevos matices a la perspectiva que de la vida pienso alcanzar.

El tiempo ...

El tiempo pasa

El tiempo madura

El tiempo puede llegar a ser tu mayor adversario

o puede ser tu mayor cómplice

Hay que conocernos para llegar a controlarlo,

hacer que sea favorable y que tenga el mismo latido

que tenga nuestro corazón.

En ese momento podemos hacernos parte del tiempo

.... partículas del tiempo

INDICE

	pág.
Resumen	i
Lista de abreviaturas	ii
Lista de tablas y figuras	iii
I. Introducción	1
1.1 Biología de <i>Entamoeba histolytica</i>	3
1.2 Clasificación	5
1.3 Ciclo de vida	7
1.4 Epidemiología y diagnóstico	8
1.5 Métodos serológicos de diagnóstico	10
1.6 Tratamiento	11
1.7 Planteamiento del problema	13
1.8 Objetivos	14
II. Materiales y medios de cultivo	15
2.1 Origen de los reactivos	15
2.2 Preparación de medios de cultivo y de soluciones	16
2.2.1 Cultivo axénico de <i>Entamoeba histolytica</i> cepa HMI:IMSS	16
2.2.2 Medios para la germinación de quistes de <i>E. histolytica</i>	16
2.2.2.1 Germinación de quistes y aislamiento de trofozoitos a partir de heces	17
III. Métodos	19
3.1 Obtención de los extractos amibianos	19
3.1.1 Electroforesis de extractos amibianos	19
3.2 Extracción de colágena	22
3.2.1 Electroforesis de la colágena extraída	22
3.3 Actividad de colagenasa	24
3.4 Curva patrón de colágena	24

3.5 Separación de amibas de cultivos polixénicos en gradientes de percoll	26
3.5.1 Gradientes de percoll-bifalato 1X	26
IV. Resultados	27
4.1 Patrón isoenzimático de cepas de <i>Entamoeba histolytica</i> mantenidas en medio polixénico	27
4.1.1 Enzima málica	27
4.1.2 Enzima hexocinasa	27
4.1.3 Enzima fosfoglucomutasa	28
4.1.4 Enzima glucosa fosfato isomerasa	28
4.2 Actividad colagenolítica en cepas de cultivos polixénicos	37
4.3 Tipo de zimodemo y actividad colagenolítica	37
V. Análisis y discusión de resultados	40
VI. Conclusiones	44
VII. Bibliografía	45

Resumen

Las amibas presentes en el intestino del hombre pueden presentarse en una relación comensal sin producir lesión alguna o bien penetrar la mucosa intestinal e iniciar la amibiasis invasiva. Se ha mencionado que durante la penetración y destrucción de los tejidos por parte de los trofozoítos de *E. histolytica*, la lámina basal y el tejido conectivo de la submucosa del intestino son los que primariamente se ven afectados. Dado que la colágena es uno de los principales componentes del tejido conectivo, la capacidad de los trofozoítos para destruir el tejido conectivo de los órganos que afectan podría deberse, entre otros factores, a la producción de enzimas con actividad colagenolítica (Minor, 1980). Muñoz y col. (1982) investigaron la actividad colagenolítica presente en trofozoítos de *E. histolytica* sobre películas de colágena, encontrando una actividad de colagenasa en la membrana del parásito, la cual presenta una mayor actividad sobre la colágena tipo I. Adicionalmente, se ha detectado una mayor proporción de estructuras electrón-densas en la membrana de amibas con diferente grado de virulencia y que guardan relación con la actividad colagenolítica que presentan (Martínez-Palomo y col., 1987). Gadashi y Kessler (1983) encuentran que los niveles de colagenasa en amibas correlacionan con la virulencia de diferentes cepas de este parásito; al igual que la capacidad para desarrollar abscesos hepáticos en animales de laboratorio (Muñoz y col., 1984).

Se han propuesto algunos marcadores de patogenicidad que pudieran tener participación dentro de los mecanismos de agresión de las amibas. El análisis de los patrones isoenzimáticos es uno de dichos marcadores; reportándose al momento un total de 22 zimodemos distintos, diez de los cuales corresponden a personas con amibiasis invasiva y muchos de los cuales están representados en México (Sargeant y col., 1978, 1980a, 1982b; Blanc y col., 1989). En trabajos experimentales, la caracterización isoenzimática es uno de los métodos más confiable para distinguir entre amibas con capacidad patogénica de aquellas no patógenas (Sargeant y col., 1980b; Mirelman y col., 1984; Martínez-Palomo, 1989) por lo que se convierte no sólo en un indicativo de la patogenicidad actual de alguna cepa, sino de su patogenicidad potencial.

El establecimiento de un diagnóstico de la amibiasis intestinal es difícil, dada la gran cantidad de portadores intestinales de quistes de *E. histolytica* aunado al empleo de métodos convencionales de laboratorio; lo que hace de la identificación certera un problema. Considerando que el patrón de zimodemos ha sido tomado como una herramienta para diferenciar el carácter patógeno de diferentes aislados amibianos y que la actividad colagenolítica amibiana tiene una alta correlación con su virulencia; en este trabajo se determinaron los patrones isoenzimáticos y la actividad colagenolítica presente en aislados amibianos procedentes de pacientes a fin de obtener una relación entre los tipos de zimodemos observados y la actividad de colagenasa determinada. Se analizaron 23 cepas aisladas de pacientes diagnosticados como positivos para *E. histolytica* en los hospitales Infantil y Juárez de la Cd. de México; de las cuales un 90% presentó un zimodemo no patógeno. Sin embargo, del total de cepas aisladas el 26.1% presentó valores de actividad de colagenasa similares a los encontrados para la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*; por lo que se concluye que el potencial patógeno de las cepas examinadas puede estar mejor representado por estudios de actividad colagenolítica.

Lista de abreviaturas

Ac.- ácido
ADN.- ácido desoxirribonucleico
ARN.- ácido ribonucleico
ATP.- adenosin trifosfato
BR.- medio de cultivo adicionado con bacterias
BRS.- Medio de cultivo suplementado con bacterias y suero fetal
EDTA.- ácido etilen diamino tetra acético
g.- gramos
GPI.- glucosa fosfato isomerasa
h.- horas
HCl.- ácido clorhídrico
HK.- hexocinasa
IgG e IgM.- biomoléculas integrantes de las inmunoglobulinas
l.- litros
M.- molar
Ma.- málica
mg.- miligramos
min.- minutos
ml.- mililitros
mm.- milímetros
mM.- milimolar
MgCl₂.-cloruro de magnesio
MTT.- dimetil tiazol bromuro de tetrazolio
NaCl.- cloruro de sodio
NADP.- nicotin adenin difosfato
NaOH.- hidróxido de sodio
nm.- nanómetros
PBS.- amortiguador salino de fosfatos
PGM.- fosfo gluco mutasa
pH.- potencial de hidrógeno
PMSF.- fluoruro de fenil etanolamina sulfonil
rpm.- revoluciones por minuto
SDS.- lauril sulfato
Sol. 1 X.- concentración normal de una solución
Sol. 10 X.- solución diez veces concentrada
TEMED.- tetrametil etilendiamino
TYI-S-33.- medio de cultivo tripsina-levadura-hierro con suero
µg.- microgramos
µl.- microlitros
µm.- micras
V.- volts

Índice de Tablas y Figuras

	pág
Tabla 1. Sistema enzimático para la determinación de isoenzimas	20
Tabla 2. Composición de la solución para revelar isoenzimas	21
Figura 1. Patrón electroforético de la colágena tipo I	23
Figura 2. Curva estándar de la concentración de colágena	25
Figura 3a. Patrón isoenzimático para la enzima málica	29
Figura 3b. Patrón isoenzimático para la enzima málica	30
Figura 3c. Patrón isoenzimático para la enzima hexocinasa	31
Figura 3d. Patrón isoenzimático para la enzima hexocinasa	32
Figura 3e. Patrón isoenzimático para la enzima fosfoglucomutasa	33
Figura 3f. Patrón isoenzimático para la enzima fosfoglucomutasa	34
Figura 3g. Patrón isoenzimático para la enzima glucosa fosfato isomerasa	35
Figura 3h. Patrón isoenzimático para la enzima glucosa fosfato isomerasa	36
Figura 4. Actividad colagenolítica en aislados de pacientes	38
Tabla 3. Tipo de zimodemo y actividad de colagenasa determinados en cepas de <i>Entamoeba histolytica</i>	39

I Introducción

Un aspecto fundamental dentro de la amibiasis es la comprensión del mecanismo mediante el cual *Entamoeba histolytica* comienza la penetración e invasión del intestino de su hospedero. A lo largo de varios años, se han realizado numerosos estudios acerca de la actividad patogénica de este protozoo; pero aún se desconocen de manera cierta los factores que la gobiernan.

Las infecciones intestinales amibianas en los seres humanos pueden presentarse como una colonización del lumen intestinal; aunque pueden llegar a invadir la mucosa del colon (Adams y Mac Lead, 1977), perforar la pared intestinal (Jiménez, 1981) y llegar incluso a diseminarse al hígado por vía porta (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970; Sattar, 1979).

El empleo de modelos experimentales en células o tejidos y en animales ha sido muy utilizado a efecto de poder determinar algunos factores propios del parásito y de sus interacciones con su hospedero. Entre los modelos animales más utilizados para el estudio de las ulceraciones amibianas se encuentran cobayos (Carrera y Faust, 1949; Anaya Velázquez y col., 1985); ratones (Ray y Chatterjee, 1981); gerbos (Chadee y Meerovich, 1985) y hámsteres; siendo estos dos últimos animales en los cuales las alteraciones ocasionadas por las amibas a nivel intestinal y hepático son más semejantes a lo que ocurre en el hombre (Reinerston y Thompson, 1951; Tanimoto y col., 1971; Ghadirian y Meerovich, 1979; Tsutsumi y col., 1984, 1986, 1988).

Dadas las características clínicas y patológicas de la amibiasis, se sugiere la participación de enzimas con capacidad histolítica y/o citotóxica que pudieran estar involucradas como factores de virulencia en el parásito. Hace varias décadas que en este parásito ya se sospechaba la existencia de enzimas con capacidad proteolítica y se proponía que la secreción de ellas podría guardar alguna relación con el mecanismo de invasión por parte del parásito hacia los tejidos del hospedero (Neal, 1956). Son varios los trabajos en los cuales se detalla la actividad proteolítica o citotóxica *in vitro* de extractos de *E. histolytica* hacia varios sustratos (Neal, 1960; Jarumilinta y Maegraith, 1969; Bos y Van De Griend, 1977; Laushbaugh y col., 1978;). Sin embargo, el análisis de estos factores no es suficiente para determinar si el parásito puede resultar patógeno o no cuando éstos entran en relación con su hospedero. Experimentalmente se ha observado la interacción de trofozoítos vivos colocados sobre diversos sustratos, lo que ha permitido correlacionar la virulencia de

varias cepas amibianas con la actividad lítica manifestada (Neal, 1960; Bos, 1979; López-Revilla y Said-Fernández, 1980; Gadasi y Kessler, 1983; Gadasi y Kobiler, 1983; Muñoz y col., 1984; Orozco y col., 1985; Ravdin y col., 1985; Orozco y col. 1987).

Tomando como base las observaciones de Villarejos (1962), Vinayak y Chitkara (1976), Ravdin y Guerrant (1982) y Martínez-Palomo y col. (1985), se sugiere que los trofozoítos pueden ejercer su efecto destructivo sobre la mucosa intestinal al menos por tres mecanismos: i) la interacción inicial de las células inflamatorias del hospedero con las amibas, ocasionando la lisis de las primeras lo cual, a su vez, origina una liberación extracelular de enzimas que pueden afectar a las células epiteliales y a la matriz de la mucosa intestinal; ii) por contacto directo de los trofozoítos con las células de la mucosa con la probable producción de toxinas y iii) por fagocitosis de células epiteliales normales o afectadas.

La liberación de material proteolítico hacia la matriz intestinal, ya sea por parte de polimorfonucleares dañados por acción de las amibas o por parte de los propios trofozoítos, involucra la participación de enzimas capaces de degradar componentes mayoritarios presentes en la lámina basal y la matriz extracelular del intestino, como es la colágena (Minor, 1980; Rojkind y Ponce-Noyola, 1982). Se ha investigado la actividad colagenolítica presente en trofozoítos de *E. histolytica* sobre películas de colágena, encontrando una actividad de colagenasa localizada en la membrana plasmática de los trofozoítos, la cual presenta una mayor actividad sobre la colágena tipo I (Muñoz y col., 1982). Así mismo, se ha detectado una mayor proporción de estructuras electrondensas en la membrana de amibas con diferente grado de virulencia y que han sido relacionadas con la actividad colagenolítica que presentan (Martínez-Palomo y col., 1987). Los niveles de la colagenasa han correlacionado con la virulencia de diferentes cepas de *E. histolytica*, determinada ésta como la capacidad para desarrollar abscesos hepáticos en animales de laboratorio (Gadasi y Kessler, 1983; Muñoz y col., 1984).

A lo largo de varios años se ha tratado de encontrar una explicación al comportamiento inusual de los trofozoítos, ya que suelen permanecer dentro de su portador como comensales y raramente como agentes invasores. Existen algunas propiedades de superficie que han permitido hacer una diferenciación biológica entre cepas patógenas y no patógenas. Así, en amibas consideradas como patógenas, podemos observar un fenómeno de aglutinación inducido por Concanavalina A (Martínez-Palomo y col., 1973; Das, 1977; Ghadirian y Meerovitch, 1984); una

carencia de carga negativa de superficie a pH neutro (Trissl y col., 1977), y una correlación entre el índice de lisis sobre células en cultivo y la virulencia de la cepa (Ravdin y Guerrant, 1982); mientras que los trofozoítos no patógenos presentan un comportamiento opuesto.

Se han propuesto algunos marcadores de patogenicidad que pudieran tener participación dentro de los mecanismos de agresión de las amibas. De estos marcadores, la inducción de abscesos hepáticos en hámster (*Mesocricetus auratus*) es uno de los criterios más aceptados para comparar el poder patogénico encontrado por diferentes cepas de amibas (Diamond y col., 1974; Tsutsumi y col., 1984). El análisis de los patrones isoenzimáticos es otro marcador de la patogenicidad amibiana y ha revelado 22 zimodemos distintos (Sargent y col., 1978, 1980a; Blanc D. y col., 1989), muchos de los cuales están representados en México (Sargeaunt y col., 1980b; Sargeaunt y col., 1982a, Sargeaunt y col., 1982b). Diez de los 22 patrones se aislaron de personas con amibiasis invasiva mientras que los restantes se obtuvieron a partir de portadores asintomáticos. Los zimodemos II y XI son los únicos que se han asociado con amibiasis hepática, y fueron aislados en México (Sargeaunt y col., 1982b). La caracterización isoenzimática es el método más confiable para distinguir amibas patógenas y no patógenas (Martínez-Palomo, 1989); al ser un marcador más estable que la virulencia (Mirelman y col., 1984) y por lo tanto se convierte no sólo en un indicativo de la patogenicidad actual de alguna cepa, sino de su patogenicidad potencial.

1.1 Biología de *Entamoeba histolytica*

Las formas móviles o trofozoítos de este parásito miden de 10 a 40 μm presentando formas alargadas con lobopodios proyectándose en el entorno y un uroide en la parte posterior. La membrana mide aproximadamente 10 nm de espesor con filopodios escasos y cortos en su borde exterior y son demasiado frágiles ante cambios en su entorno. Los trofozoítos carecen de un citoesqueleto bien definido o microtúbulos citoplasmáticos, no presentan un complejo de membranas semejante al aparato de Golgi o al retículo endoplásmico, no se han detectado mitocondrias ni un sistema de lisosomas primarios o secundarios como en eucariontes (Wittner, 1968; Motalvo y col., 1981; Weinbach y Diamond, 1974). La mayor parte del citoplasma amibiano, visto en cortes, esta ocupada por vacuolas incluidas en la matriz citoplásmica con diámetro de 0.5 a 9.0 μm . En lo que podría considerarse como los

lisosomas amibianos, las enzimas líticas se encuentran como parte integral de la membrana (Martínez-Palomo, 1982). Puede observarse una red de túbulos y vesículas semejante a lo que sería un retículo endoplásmico liso. Algunos componentes ribosomales se encuentran dispuestos en el citoplasma tanto de trofozoítos como de quistes en forma de cúmulos helicoidales de aproximadamente 300 nm de longitud y 40 nm de diámetro. Si bien es cierto que la división nuclear ocurre sin disolución de la membrana nuclear; prácticamente se conoce muy poco acerca de la organización estructural del núcleo. Los grupos helicoidales mencionados anteriormente forman inclusiones citoplasmáticas conocidas como cuerpos cromidiales, cuya estructura tan especial aún no tiene una explicación funcional certera. Actualmente se desconoce el origen y número exacto de cromosomas presentes en *Entamoeba histolytica*, pero se han reportado de seis a nueve bandas de ADN, según la técnica de electroforesis en pulsos de campo gradiente (Reyes-López, 1989; Valdez y col., 1989) y seis cromosomas por microscopía de fluorescencia y de transmisión electrónica (Argüello y col., 1992).

En áreas donde se concentran componentes ricos en actina tales como canales fagocíticos y de macropinocitosis se ha observado material fibroglandular (Martínez-Palomo y col. 1974). A diferencia de lo anterior, en el citoplasma nuclear de trofozoítos en división se han detectado microtúbulos (Martínez-Palomo, 1982; Argüello y col., 1992). Se sabe que la fuerza producida por los pseudópodos amibianos en el proceso de penetración de una gota de líquido es suficiente para permitirle al parásito abrirse paso entre las células epiteliales mediante la actividad de los pseudópodos (Smith y Meerovitch, 1982).

La adhesión de las amibas a los sustratos depende de mecanismos tanto específicos como el reconocimiento amibas-célula blanco (Kobiler y Mirelman, 1980; 1981; Ravdin y col., 1984; Orozco y col., 1985); o bien inespecíficos como es la adhesión a sustratos inertes (Gillin y Diamond, 1978).

Acerca del proceso de enquistamiento de *Entamoeba histolytica* se sabe muy poco. Los quistes son estructuras de resistencia, redondas o ligeramente ovaladas, entre los 8 y 20 μm . La pared está integrada por filamentos de quitina formando una red compacta constituida por varias capas concéntricas con un grosor de 125 a 150 nm. Los núcleos pueden apreciarse fácilmente al microscopio de luz en preparaciones teñidas con yodo (Chávez y col., 1978).

Los trofozoítos presentan un metabolismo aerobio facultativo, pues aunque viven en ambientes con bajas tensiones de oxígeno, pueden sobrevivir en ambientes

bien oxigenados (Bracha y Mirelman, 1984). Los carbohidratos son la principal fuente de energía de estas amibas y se han encontrado enzimas glucolíticas poco usuales (presentes sólo en algunas bacterias); además de carecer de mitocondrias, de citocromos y del ciclo de los ác. tricarbónicos (Weinbach y Diamond, 1974). La glucosa se degrada hasta piruvato mediante la vía de Embden-Meyerhoff utilizando pirofosfato inorgánico en lugar del ATP en varios pasos de esta vía produciendo finalmente etanol y bióxido de carbono (Weinbach, 1981; Eubank y Reeves, 1982). Se sugiere que la respiración amibiana puede estar involucrada en la remoción de oxígeno en ambientes con altas concentraciones de este gas, como son los órganos que pueden llegar a invadir y que tienen muy buena irrigación sanguínea; pero faltan datos que apoyen esta hipótesis (Weinbach, 1981).

1.2 Clasificación

La clasificación taxonómica de *Entamoeba histolytica* es la siguiente (Albach y Booden, 1978; Guerrant, 1986):

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosea
Subclase	Gymnamoebia
Orden	Amoebida
Suborden	Acantophodina
Familia	Endamoebidae
Género	Entamoeba
Especie	<i>Entamoeba histolytica</i>

El género *Entamoeba* incluye varias especies de parásitos del hombre, cuya clasificación esta basada en el número de núcleos presentes en los quistes maduros. Para la especie *E. coli* se reportan ocho núcleos en los quistes; los quistes de *E. hartmanni* y *E. histolytica* presentan cuatro núcleos; pero pueden ser diferenciados en base a que los quistes de la primera miden menos de 10 µm. Para *E. gingivalis* no se

ha reportado ninguna fase quística (Neal, 1966). De este grupo de amibas, la especie *Entamoeba histolytica* es la única que representa un problema de salud importante para el hombre. La cepa Laredo es una especie no patógena de *Entamoeba* ya que a pesar de presentar cuatro núcleos como *E. histolytica*, carece de poder patógeno, puede sobrevivir a temperatura ambiente, presenta un patrón isoenzimático característico (Meraz y col., 1986), no es reconocida por un anticuerpo monoclonal específico para la especie de *E. histolytica* (Del Moro, 1987), no es reconocida por una sonda molecular específica (Bracha y col. 1990) y no presenta hibridación con porciones de ARNr de *E. histolytica* (Bhattacharya, 1988).

Se han planteado algunas hipótesis para tratar de explicar el porqué algunos trofozoítos de *E. histolytica* pueden comportarse como comensales dentro de su portador o bien pueden presentar un comportamiento invasivo. Dichas propuestas son:

a) *E. histolytica* comprende una sola especie de carácter invasivo cuyas lesiones pueden desencadenar o no manifestaciones clínicas (Hoare, 1952; Elsdon, 1968).

b) *E. histolytica* esta formada por dos especies de amibas con la misma morfología pero de las cuales sólo una es patógena (Brumpt, 1925).

c) Hay una sola especie de *E. histolytica* formada por un número no determinado de cepas diferentes, que pueden o no actuar como formas patógenas (Mirelman y col., 1986).

Con respecto a la segunda de las anteriores hipótesis; los zimodemos han sido empleados no sólo para obtener una clasificación de diferentes especies del género *Entamoeba*, sino que se han detectado subespecies amibianas dentro de la especie de *E. histolytica* (Reeves y Bischoff, 1968; Sargeant y Williams, 1979).

Desde 1925, Brumpt postuló la existencia de dos especies de *Entamoeba histolytica* morfológicamente idénticas, pero una de ellas no patógena e incapaz de causar enfermedad (*E. dispar*) y la otra con capacidad invasiva (*E. dysenteriae*) hacia el humano. Adicionalmente al análisis de isoenzimas, esta hipótesis también encuentra apoyo en los resultados de diversos trabajos en los que han empleado sondas moleculares con el fin de determinar diferencias genotípicas entre cepas patógenas y no patógenas de *E. histolytica* (Garfinkel y col., 1989; Meraz y col., 1989; Tannich y col., 1989; Bracha y col., 1990). Así mismo, el empleo de diferentes anticuerpos monoclonales actualmente ha podido distinguir entre cepas de *Entamoeba histolytica* con zimodemo patógeno de aquellas con un patrón no invasivo (Strachan y

col., 1988; Muñoz y col., 1990; Petri y col., 1990; Tachibana y col., 1990; Torian y col., 1990). Las aportaciones de estas innovadoras estrategias podrían ofrecer bases para un mejor entendimiento del número de especies existentes, mejores métodos de diagnóstico de la enfermedad y elementos para conseguir una inmunidad protectora.

1.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* en el hombre comienza con la ingestión de quistes maduros del parásito. Si las condiciones presentes en microambientes del íleo bajo y del ciego son favorables, puede ocurrir el desenquistamiento de los trofozoítos contenidos en cada quiste. Al desenquistarse, las amibas adquieren movilidad, lo que les permite dispersarse y colonizar el intestino. Cuando los trofozoítos llegan a la mucosa del colon, algunos se multiplican por fisión binaria y se establecen en úlceras en la mucosa; algunos otros son eliminados por las heces pero mueren rápidamente en el exterior sin llegar a ser infectivos; y otros más se transforman en quistes (Martínez-Palomo y col., 1989). En el estado de prequiste, el parásito es una forma mononucleada más pequeña que el trofozoíto y poco después aparecen las formas maduras de quistes que son tetranucleadas. Estas formas son más pequeñas que los trofozoítos (8-20 μm) y se forman por dos divisiones sucesivas de células mononucleadas. Cada uno de los cuatro núcleos resultantes se divide nuevamente formando en total ocho núcleos hijos; los cuales después podrán originar ocho amibas mononucleadas (Martínez-Palomo y col., 1982). Los quistes están rodeados por una pared que les permite sobrevivir en condiciones ambientales adversas que pueden presentarse fuera del hospedero como son medios con un pH variable, condiciones de desecación y cambios de temperatura. De esta manera, los quistes se encuentran aptos para ser ingeridos por el hombre y completar el ciclo (Stone, 1935; Brady y col., 1943; Chávez y col., 1978).

Ayudados de modelos animales de experimentación se ha observado que en las etapas iniciales de la amibiasis invasiva, la mayoría de los trofozoítos se encuentran fijados a la delgada capa de moco intestinal (Martínez-Palomo, 1989). En etapas posteriores, las amibas se unen a la superficie laminar de la mucosa sólo en algunas regiones interglandulares, en donde aparentemente los parásitos penetran a través de movimientos de los pseudópodos (Tsutsumi y col., 1988). Las lesiones se extienden lateralmente a lo largo de la mucosa y aunque la pared intestinal pudiera actuar como barrera física, estas lesiones eventualmente se abren en puntos focales permitiéndoles

a las amibas invadir la submucosa (Martínez-Palomo y col., 1989). En estos sitios se ha demostrado la conglomeración y lisis de numerosos polimorfonucleares alrededor de las amibas; por lo que se postula que la lisis de polimorfonucleares ocasionada por la presencia de los parásitos puede participar en el desarrollo de las lesiones intestinales amibianas, en combinación con fenómenos de daño y/o fagocitosis de células epiteliales por parte de los trofozoítos y procesos de liberación de potentes enzimas que degraden componentes de la matriz extracelular (Tsutsumi y col., 1988).

1.4 Epidemiología y diagnóstico

La edad de las personas con la más alta incidencia de infección y sintomatología clínica amibiana en México, se encuentra entre los veinticinco y cuarenta y cuatro años; aunque esto no excluye a que personas de cualquier edad estén expuestas a contraer esta infección. La manera en la cual los quistes de *E. histolytica* pasan de una persona infectada a un individuo susceptible a contraer la enfermedad, muy frecuentemente depende del nivel de desarrollo económico y de las prácticas de higiene llevadas en algunas regiones; así como de la naturaleza de los alimentos ingeridos, ya que las dietas incompletas o ricas en carbohidratos pueden ser factores que predispongan al establecimiento del parásito en el ser humano (Sepúlveda y Treviño-García, 1989). Por lo anterior, la amibiasis adquiere una particular importancia sanitaria en países en desarrollo. En México se reportaron 4,335 casos de abscesos hepáticos amibianos para el año de 1990 (Boletín Mensual Epidemiología, Julio 1991); no obstante hay que considerar que la incidencia de abscesos de esta índole no siempre refleja la frecuencia de la ocurrencia de la enfermedad a nivel intestinal. De hecho, la mayoría de las personas infectadas por amibas son portadores sanos de este parásito. Estas circunstancias facilitan una rápida propagación del parásito aumentando también las posibilidades de reinfección; lo que contribuye al mantenimiento del carácter endémico de la amibiasis invasiva en algunas poblaciones (Sepúlveda, 1982).

La frecuencia de la amibiasis intestinal no es un buen índice para estimar la incidencia de la enfermedad amibiana debido a la inespecificidad de los síntomas. En cambio, la frecuencia del absceso hepático amibiano es una medida confiable de la morbilidad, debido a que las lesiones pueden identificarse con mayor facilidad y certeza (Sepúlveda y Treviño-García, 1989).

En 1984 se estimó un total de 500 millones de personas en el mundo infectadas

por *E. histolytica*, de las cuales en 40 millones se desarrolló alguna complicación de colitis o absceso extraintestinal, ocasionando 40,000 muertes (Walsh, 1988). Sin embargo, poco más del 90% de los individuos infectados generalmente son asintomáticos, cuya prevalencia puede ser un indicador de la magnitud de la infección y transmisión del parásito en un medio dado, pero que no reflejan la prevalencia de lo que se considera como amibiasis invasora (W.H.O. Scientific Working Group, 1980; Sepúlveda, 1982).

La condición clínica más común de la colitis amibiana es una diarrea intensa acompañada por dolores abdominales y tenesmo. Puede presentarse sangre en las heces o moco sanguinolento. Después de una diarrea inicial puede desencadenarse una infección intestinal crónica, en cuyos casos la diarrea y la disentería se ven interrumpidos por períodos de constipación y malestar estomacal ligero. Las personas que han desarrollado un absceso hepático amibiano pueden manifestar dolor sobre el hipocondrio derecho y una gran sensibilidad al contacto en el área del hígado. En algunos casos se presenta un edema sobre las costillas y en abscesos muy grandes se puede observar una protuberancia en el subcostado derecho o en el área epigástrica (Brandt y Tamayo, 1970).

Clinicamente, hay cuatro tipos diferenciables de amibiasis intestinal: a) disentería o diarrea sanguinolenta, b) colitis fulminante c) apendicitis amibiana y d) ameboma del colon (Guarner, 1989).

a) Los síndromes diarreico y disentérico representan el 90% de los casos de amibiasis intestinal invasora. La disentería se caracteriza por un promedio de tres a cinco evacuaciones muco-sanguinolentas al día, con dolor cólico leve que precede a la evacuación, y tenesmo rectal (Adams y MacLeod, 1977). La evolución clínica de ambos malestares es moderada y los síntomas desaparecen rápidamente con el tratamiento.

b) Las lesiones que se presentan en la colitis fulminante son del tipo de las úlceras necróticas en grandes áreas del colon. Hay de 20 ó más evacuaciones en 24 h, consistentes de materia fecal con sangre o sólo sangre. Puede presentarse dolor abdominal generalizado, anorexia, náusea, fiebre alta y la evolución clínica es rápida. Las úlceras que se presentan son grandes, confluentes y de apariencia necrótica en un examen endoscópico (Sepúlveda y Treviño-García, 1989).

c) Los amebomas son lesiones cuya formación esta asociada con necrosis, inflamación y edema de la mucosa y submucosa del colon. Entre la sintomatología puede presentarse la diarrea sanguinolenta, el dolor abdominal y una

masa palpable en la región abdominal. Puede presentarse una perforación del colon con peritonitis aguda (Sepúlveda y Treviño-García, 1989).

Adicionalmente a estas manifestaciones clínicas en el paciente, para el diagnóstico de la amibiasis invasora intestinal se puede practicar un examen microscópico de evacuaciones o de muestras del moco sanguinolento, para identificar trofozoítos móviles del parásito. Los exámenes de rectosigmoidoscopia y colonoscopia se recomiendan para denotar lesiones características en estas regiones (Sepúlveda y Treviño-García, 1989).

Dentro de los tipos de amibiasis extraintestinal, el absceso hepático es el de mayor importancia dada su frecuencia. El cuadro clínico característico puede ser un inicio repentino, con dolor en la región hepática y el hipocondrio derecho, irradiado al hombro derecho y/o a la región escapular. La fiebre puede oscilar entre los 38° y 40°C. Se presenta hepatomegalia dolorosa, detectable por radiología como un absceso en la parte superior del órgano. Puede hallarse una ictericia pronunciada en caso de abscesos múltiples (Landa y col., 1974), así como una leucocitosis (12,000 - 30,000 células/mm³), cifras altas de fosfatasa alcalina y de bilirrubina directa (Sepúlveda y Treviño-García, 1989).

El estudio por *gammagrafía* asegura la existencia de un absceso hepático amibiano agudo y lo diferencia de tumores malignos. El *ultrasonido* tiene una eficacia del 90% para detectar abscesos hepáticos y, debido a su naturaleza, se puede practicar cuantas veces se requiera (Sepúlveda y Treviño-García, 1989). La *tomografía axial por computadora* es el método de diagnóstico más preciso pero es el más costoso (Katzenstein y col., 1982).

1.5 Métodos serológicos de diagnóstico

Existen diferentes métodos serológicos que detectan anticuerpos anti-amibianos, entre los cuales se encuentra:

Hemoaglutinación indirecta.- es una técnica de gran sensibilidad y especificidad, capaz de detectar anticuerpos que pueden estar presentes muchos años después de una infección amibiana; por lo que se puede usar para estudios endémicos de la enfermedad en una población. No requiere de equipos muy sofisticados para su realización (Krupp y Powell, 1971; Kagan, 1976; Hartmann, 1980; Robert y col., 1990).

Contrainmunolectroforesis.- es una técnica muy sensible, rápida y sencilla que detecta anticuerpos que resultan de una amibiasis invasiva reciente (Sepúlveda y col., 1982).

Aglutinación con látex.- es un método sensible y específico, capaz de detectar infecciones persistentes, es sencillo y requiere poco material (Morris y col., 1970). Una modificación a este método es reportada por Robert y col. (1990), la cual ayuda a diferenciar pacientes con amibiasis hepática de casos de amibiasis intestinal y de trastornos no amibianos. Se aumenta la sensibilidad (98%), especificidad (96%) y rapidez (5 min).

Inmunofluorescencia Indirecta.- es sumamente sensible y específica para la identificación de anticuerpos de tipo IgG o IgM contra *E. histolytica* (Ambroise-Thomas y K. Truong, 1972; Ray y col., 1974), pero su automatización no es factible (Stamm y col., 1976).

Análisis Inmunoenzimático (ELISA).- técnica ampliamente usada, de suma sensibilidad y precisión, fácil de realizar y automatizar con fines de aplicación en laboratorios de análisis, capaz de diferenciar infecciones antiguas y recientes (Bos y col., 1976; Kagan, 1976; Gahndi, 1987; Sharma y col., 1988; Muñoz y col., 1990).

1.6 Tratamiento

A lo largo de más de cinco décadas se han propuesto diferentes drogas farmacológicas con el fin de destruir a las amibas en el lumen intestinal, de prevenir su dispersión hacia otros tejidos, de matar a los parásitos presentes en los tejidos que invaden, de controlar los síntomas y de erradicar la amibiasis invasiva. Dentro de dichos medicamentos se pueden mencionar algunos que no pueden seguir administrándose debido a su indisponibilidad, toxicidad o reincidencia de la enfermedad después de la terapia. Algunos de ellos son:

8-hidroxiquinolinas.- son compuestos sumamente tóxicos de efecto luminal, administrados a pacientes asintomáticos portadores de quistes. Se puede desarrollar neuritis óptica o ceguera como efecto secundario (Oakley, 1973, *Medd. Lett. Drugs Ther.*, 1974, Pittman y col., 1974). La furunculosis generalizada, fiebre y prurito anal también son efectos colaterales. Actualmente sólo puede ser obtenida bajo pedido a los Laboratorios *Searle*.

Furoato de diloxanida.- recomendada para portadores asintomáticos, cuyo tratamiento puede repetirse en caso de reincidencia de quistes. Como efectos

secundarios se presentan molestias gastrointestinales. Disponible sólo bajo pedido a *Center for Disease Control* (Wolfe, 1973).

Emetina.- combate mejor a las formas móviles del parásito que a los quistes. Su prevalencia en el organismo es muy duradera, por lo que un segundo tratamiento debe intentarse transcurridas seis semanas. Tiene efectos tóxicos cardiovasculares (Schwartz y Herrero, 1965) e inhibe la síntesis de proteínas (Huang y Grollman, 1970). La Dehidroemetina es un análogo menos tóxico, pero igualmente no debe administrarse durante el embarazo, ni a pacientes con trastornos renales o cardiovasculares (Guarner, 1989).

Fosfato de cloroquina.- se recomienda cuando el uso de emetina no es satisfactorio, especialmente en casos de absceso hepático o pulmonar. Debe emplearse junto con un amebicida luminal ya que es de rápida absorción intestinal. Como efectos colaterales por uso prolongado se puede presentar alopecia, discrasia sanguínea, neuromiopatía, alteraciones auditivas y visuales. Puede ocasionar defectos congénitos (Guarner, 1989; Hart y Nautan, 1964).

Sulfato de paramomicina.- es un antibiótico con efecto directo sobre las amibas (Thompson y col., 1959). Recomendado en casos leves de amibiasis intestinal. Pueden presentarse malestares gastrointestinales ya que también actúa sobre bacterias patógenas y no patógenas de la flora intestinal (Simon y col., 1967).

Metronidazol.- compuesto de mayor uso actual con acción intestinal y extraintestinal sobre los trofozoítos. Existen varios nitroimidazoles con estructura y actividad muy semejantes a la del metronidazol (tinidazol, flunidazol, ronidazol, dimetridazol y satranidazol). Al parecer pueden presentarse tratamientos efectivos con una sola dosis del compuesto, aunque es recomendable seguir un tratamiento de 5 a 10 días de administración del fármaco (Guarner, 1989). Pueden presentarse malestares gastrointestinales, sabor metálico en la boca, y complicaciones si se ingieren bebidas alcohólicas durante su administración (Gupta y col., 1970). Este compuesto puede atravesar la barrera placentaria, tiene propiedades mutagénicas en bacterias y carcinogénicas en animales de experimentación (Rustia y Shubick, 1972); por lo que su empleo debe ser bajo estricta supervisión médica (Voogd y col., 1974; *Med. Lett. Drugs Ther.* 1975).

1.7 Planteamiento del problema

El establecimiento de un diagnóstico de la amibiasis intestinal es difícil, dados los numerosos portadores intestinales de quistes de *Entamoeba histolytica*. En pacientes con disentería amibiana y trofozoítos móviles en las heces, el diagnóstico no es difícil; pero tratándose de casos menos obvios es necesario que las heces colectadas sean sometidas a tratamientos especiales para evidenciar al parásito como es el examen directo al microscopio, técnicas de flotación o de tinción (Sawitz y Faust, 1942; Stamm, 1957). Son pocas las personas verdaderamente entrenadas y capaces de poder identificar protozoarios intestinales y entre ellos a *E. histolytica*. Particularmente en algunos laboratorios clínicos y centros de salud de México, parece existir poco o ningún interés por parte del personal encargado de los análisis coproparasitológicos, hacia la identificación de estas amibas; lo que hace de la identificación certera un problema más difícil que puede llegar incluso a que se pasen inadvertidos casos positivos de *E. histolytica* en las muestras; o que se administren drogas potencialmente tóxicas al paciente cuando se le diagnostica equivocadamente la presencia de amibas en su muestra. Por otra parte, la presencia de quistes de este parásito en las muestras fecales, no es evidencia suficiente de que el paciente examinado presente amibiasis invasiva o que es portador sin síntomas de la enfermedad.

Pese a la mayor proporción de portadores asintomáticos de *Entamoeba histolytica*, existe un porcentaje importante de personas infectadas por este parásito en los que se puede desarrollar una amibiasis invasiva expresada como lesiones intestinales o abscesos hepáticos principalmente. Por esta razón se debe prestar mucha atención en el diseño de estrategias encaminadas a una caracterización adecuada de los portadores de este parásito con el fin de detectar y controlar a aquellos pacientes en los que potencialmente se puedan desarrollar complicaciones clínicas; con lo cual a las personas que presenten amibas comensales se les pueda aplicar un tratamiento diferente (Lancet, 1985).

Se ha mencionado que dentro de los marcadores de patogenicidad que actualmente son considerados, el patrón de zimodemos ha sido tomado como una herramienta epidemiológica estándar capaz de diferenciar el carácter patógeno o no patógeno de diferentes aislados amibianos. Por otra parte, se ha reportado que la actividad colagenolítica presente en cepas patógenas de este parásito tiene una alta correlación con la virulencia que manifiestan (Muñoz y col. 1984). Así mismo, se ha

determinado dicha actividad en cultivos polixénicos de *E. histolytica* encontrando que esta relacionada con la patogenicidad presente en las cepas analizadas (Magos y col., 1989).

1.8 Objetivos

En base a lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue la caracterización de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* en aislados a partir de pacientes mediante la determinación de su patrón isoenzimático y comprobar su grado de virulencia por la evaluación de la actividad colagenolítica.

Los objetivos particulares que se cubrieron fueron:

- i) Determinar los patrones isoenzimáticos de los trofozoítos aislados a partir de pacientes.
- ii) Evaluar la actividad colagenolítica presente en los trofozoítos aislados.
- iii) Obtener una relación entre los tipos de zimodemos observados y la actividad colagenolítica determinada.

II Materiales y medios de cultivo

2.1 Origen de los reactivos

Baker Analyzed

Ac. acético, Ac. cítrico, Ac. clorhídrico, Ac. láctico, Acetona, Azul de bromotimol, Cloruro de potasio, Cloruro de magnesio, Cloruro de sodio, Etanol absoluto, Fosfato de potasio monobásico, Fosfato de potasio dibásico, Hidróxido de sodio, Isopropanol, Metanol, Sulfato de amonio, Sulfato de magnesio.

Bio-Rad

Persulfato de amonio, TEMED.

Bioxon

Agar bacteriológico, Peptona de biotriptasa.

Hy-Clone

Suero fetal de bovino.

Serva Fine Biochem.

Acrilamida, bis-acrilamida.

Sigma Chemical Co.

Ac. ϵ -aminocaproico, L (+), Ac. maleico, Ac. L (-) málico, Ac. ascórbico, Albúmina de suero de bovino, ATP, Azul de Coomassie, Bifalato de potasio, L-Cisteína, Citrato férrico, Cloruro de calcio, DL-Ditiotreitol, EDTA, D-Fructosa 6-fosfato, Glicina, α -D Glucosa 1-fosfato, Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, Glutaraldehido, MTT, NADP, Percoll, Pepsina, PMSF, Rojo de sirio, Sacarosa, Trizma base.

Thomas Scientific

Membranas de diálisis, papel indicador de pH.

2.2 Preparación de medios de cultivo y de soluciones

2.2.1 Cultivo axénico de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS

El medio de cultivo empleado fue el TYI-S-33 adicionado con suero de bovino al 10% inactivado, más vitaminas (Diamond, 1982).

El suero de bovino se descomplementó colocándolo en un baño metabólico (Blue M) a 56°C por 30 min, añadiendo 20 ml de la solución de vitaminas de Diamond por cada 100 ml de suero inactivado.

El cultivo y crecimiento de *Entamoeba histolytica* en condiciones axénicas se llevó a cabo en esterilidad, colocando inóculos de 250 µl de amibas a partir de un tubo confluyente de la misma cepa en tubos de ensaye de 16 X 120 mm con tapón de rosca, a los cuales se les adicionaron previamente 10 ml de medio TYI-S-33 complementado con suero. Después de 48 h de incubación a 37°C, se seleccionó un tubo con crecimiento confluyente de las amibas, se colocó en un baño de hielo por 10 min para despegar las células de las paredes y se agitó suavemente para que se resuspendieran homogéneamente. Esta suspensión se centrifugó a 1,200 rpm por 5 min, la pastilla se resuspendió en 25 ml de PBS 1X pH 7.4 y se hizo un conteo en una cámara de Newbauer, utilizando un microscopio invertido (Zeiss Invertoscop D). Cuando sólo se hizo resiembra de las cepas, se siguió el mismo procedimiento haciendo cambios a medio fresco cada 72 h.

2.2.2. Medios para la germinación de quistes de *E. histolytica*

Las cepas polixénicas que en este estudio se procesaron fueron proporcionadas por la Biól. Ma. de los Santos Campos como parte de un proyecto adicional llevado simultáneamente en el laboratorio; pero se expone brevemente la metodología requerida. El medio empleado para germinar quistes fue el medio de Robinson (1968) el cual consta de dos fases; una sólida de agar al 1.5% adicionado con NaCl al 0.7%, y una fase líquida formada por el medio BRS. El medio BRS requirió la preparación de varias soluciones como son:

A.- Medio definido "R" para *Escherichia coli* cepa B

i) Solución 10 X

Ac. cítrico monohidratado	50.0 g
Ac. láctico 90.08%	100.0 ml
Cloruro de sodio	125.0 g

Fosfato monobásico de potasio	12.5 g
Sulfato de amonio	25.0 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	1.25 g

Estos reactivos se disolvieron y se aforó a 2.5 l con agua desionizada. Se distribuyó en matraces de 250 ml y se almacenaron a 4°C.

ii) Solución de trabajo 1 X

Se tomaron 50 ml del medio "R" 10 X, se les agregaron 1.25 ml de azul de bromotimol al 0.04 %, se ajustó el pH a 7.0 (Corning) con NaOH al 40% y se aforó a 450 ml. La solución se esterilizó a 15 libras/pulgada² por 20 min y se almacenó a 4°C.

B.- Medio basal "BR"

Se prepararon 125 ml de medio "R" en matraces Erlenmeyer de 250 ml adicionados con 2 ml de un cultivo de *Escherichia coli* cepa B. Los matraces se colocaron en un agitador (New Brunswick 25) por toda una noche y se almacenaron a 4°C. Antes de utilizar este medio, se procuró que el pH de la solución no excediera de 7.3.

C.- Medio completo "BRS"

Se mezclaron volúmenes iguales de suero de bovino descomplementado y de Medio "BR", almacenando a 4°C.

D.- Bifalato de potasio 10 X

Se agregaron 51 g de bifalato de potasio a 460 ml de agua desionizada (disuelto con NaOH al 40%). El pH se ajustó a 6.3 con NaOH 10 N y se aforó a 500 ml. La solución se esterilizó bajo las condiciones mencionadas y se distribuyeron 10 ml en tubos de 15 X 150 mm estériles, almacenando a 4°C.

Solución de trabajo 1 X

Se preparó diluyendo la solución concentrada de bifalato con agua desionizada estéril y se almacenó a 4°C.

2.2.2.1. Germinación de quistes y aislamiento de trofozoítos a partir de heces

Aislamiento primario: Se adicionaron aproximadamente 50 mg de heces frescas sin tratamiento previo alguno, a matraces Erlenmeyer de 25 ml con medio de

Robinson, aproximadamente 10 mg de almidón de arroz estéril, dos gotas de antibiótico (penicilina-estreptomina) y 5 ml de medio "BR". Este resuspendido se incubó a 37°C por 48 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, se hizo una revisión de las muestras en un microscopio estándar (Olympus BH-2) de las muestras; conservando aquellas que resultaron positivas para *E. histolytica* (según descripciones dadas por De la Torre M., comunicación personal). Se eliminó el sobrenadante agregando nuevamente almidón de arroz, 2 gotas de la solución patrón de antibióticos, 5 gotas de bactopectona al 20%, 3 ml de biftalato 1X y 0.5 ml de medio "BRS".

Mantenimiento: El mantenimiento de aquellas cepas amibianas que desenquistaron se realizó por adición de medio fresco al matraz o transfiriendo las células a nuevos matraces con este mismo medio cada 48 h y manteniéndolos a 37°C; o bien, transfiriendo las células al medio de Boeck y Drobhlav modificado por De la Torre (1970), el cual consiste de una fase sólida de huevo coagulado y sangre humana (5 ml/huevo); y una fase líquida formada por solución Ringer pH 7.0, realizando las resiembras como se indicó anteriormente.

III METODOS

3.1.- Obtención de los extractos amibianos (Mathews y col., 1983)

Las células se cosecharon por centrifugación una vez alcanzada la fase logaritmica (48 h) en el medio adecuado. Las cepas axénicas se mantuvieron en medio TYI-S-33, mientras que aquellas provenientes de cultivos mixtos se preservaron en medio de Robinson.

i).- Los tubos de las cepas axénicas (HM1:IMSS y Laredo) se colocaron en hielo por 10 min revisando que las células se hubieran despegado de las paredes y se centrifugó a 1,200 rpm por 5 min.

ii).- Si las células provenían de un cultivo mixto, la fase líquida del medio de Robinson se propulsó suavemente contra la fase sólida del medio para despegar las células. Este resuspendido se centrifugó a 1,200 rpm realizando tres lavados con PBS pH 7.4, a fin de retirar la mayor cantidad posible de bacterias y desperdicios del medio. Del último lavado se tomó el sobrenadante para utilizarse como control bacteriano en la electroforesis.

Las pastillas obtenidas fueron transferidas a tubos eppendorf y centrifugadas a 1,200 rpm por 5 min para el caso de amibas axénicas o mixtas; y para obtener las pastillas bacterianas, el sobrenadante obtenido se centrifugó a 5,000 rpm por 15 min. Tanto a las pastillas amibianas como a las bacterianas, se les adicionó un volumen de amortiguador de lisis (Ditiotreitól 10 mM, EDTA 10 mM y Ac. ϵ -amino caproico 10 mM) similar al volumen de la pastilla.

Las células se rompieron haciendo cuatro ciclos de congelación-descongelación, colocando los eppendorf en etanol-acetona (2:1) y luego en agua a 37°C. Se tomó una muestra (15 μ l) de cada extracto, se le determinó concentración de proteína (Bradford, 1976) y al resto se le adicionaron 20 μ l de sacarosa al 70% por cada 50 μ l de muestra. Los extractos se guardaron en un congelador a -75°C (Queue Systems) hasta el momento de usarse.

3.1.2 Electroforesis de extractos amibianos (Meza y col., 1986)

Se prepararon geles de acrilamida en gradiente del 3 al 7% con bisacrilamida al 0.8%, TEMED al 0.084% y persulfato de amonio al 0.125%, en amortiguador Tris-NaOH 0.015 M, ác. maleico 0.015 M, MgCl₂ 0.0032 M, EDTA 0.015 M pH 7.4;

en condiciones no desnaturalizantes (sin SDS ni inhibidores de proteasas). El gel concentrador se formó con acrilamida al 2.5 %, bisacrilamida al 0.095% y sacarosa al 50% en el mismo amortiguador. Los geles se precorrieron a 45 V por 20 min en amortiguador de corrida (Tris-NaOH 0.1 M, ác. maleico 0.1 M, MgCl₂ 0.021 M, EDTA 0.001 M). Transcurrido el tiempo de precorrida, en cada pozo se colocó el volumen de muestra necesario para cada una de las enzimas reveladas (25-50 µl). Las muestras se corrieron a 180 V durante 5 h en el mismo amortiguador, empleando una unidad vertical de electroforesis (LKB 2001) mantenida en refrigeración a 4°C durante la corrida, para que la temperatura dentro de la cámara no excediera los 10°C.

Una vez terminada la electroforesis y dependiendo de la enzima a determinar (Tabla 1), el gel se transfirió a un refractario con la solución sustrato-reveladora para cada enzima (Tabla 2) y se dejó en incubación con agitación leve (Bellco) a 37°C entre 15 y 45 min (Mathews y col., 1983). Se enjuagó con agua desionizada y los geles se fijaron con ác. acético al 7% (v/v), se secaron y se les tomó fotografía.

Tabla 1. Sistema enzimático utilizado para la determinación del patrón isoenzimático (Mathews y col., 1983)

Málica (MA)	E.C.1.1.1.40.
Hexocinasa (HK)	E.C.2.7.1.1.
Fosfoglucomutasa (PGM)	E.C.2.7.5.1.
Glucosa fosfato isomerasa (GPI)	E.C.5.3.1.9.

Tabla 2.- Composición de la solución sustrato-reveladora para las isoenzimas determinadas.

Enzima	Cantidad (µl) de:				ATP (mg)	Sustrato	5 ml de Tris 1 M a pH :	MgCl ₂ 0.1 M (ml)
	NADP ^a	MTT ^b	PMS ^c	Gluc-6-P deshidrog. ^d				
Ma	312	270	250	--	--	Ac. málico 3 mM ^e 0.15 ml	7.4	5
Hk	375	324	250	960	72	Glucosa 95 mg	7.4	3.8
PGM	156	270	250	400	--	Gluc-1-P 100 mg	7.4	5
GPI	156	135	250	200	--	Fruc-6-P 18 mg	8.0	5

Las soluciones fueron mezcladas y se adicionaron los reactivos indicados en cada caso, aforando a 50 ml con agua desionizada.

- a.-tomados a partir de una solución con 0.032 g/ml de agua.
- b.-tomados a partir de una solución con 0.037 g/ml de agua.
- c.-tomados a partir de una solución con 0.008 g/ml de agua.
- d.-tomados a partir de una solución con 0.847 mg/ml de agua.
- e.-tomados a partir de una solución 0.1 M pH 7.0.

3.2 Extracción de colágena (Rojkind y col., 1979)

En el método seguido se lavó una placenta de humano con agua hasta eliminar la sangre superficial, se cortó en trozos pequeños, se homogenizaron en frío colocándolos en 500 ml de ác. acético 0.25 M + pepsina (0.25 mg/ml) y se dejaron en agitación a 4°C por 24 h. Esta mezcla se centrifugó a 4°C a 4,500 rpm (Sorvall RC-5B rotor GS3) por 2 h, se decantó el sobrenadante claro, se neutralizó con NaOH 1 M y se almacenó a 4°C. Al sedimento se le agregó nuevamente pepsina a igual concentración y se siguió el mismo procedimiento hasta completar tres ciclos de digestión.

Los sobrenadantes se juntaron y se dializaron contra Tris-HCl 0.05 M pH 7.3 + NaCl 0.45 M durante 24 h a 4°C. El dializado resultante se centrifugó en las mismas condiciones, decantando y neutralizando el sobrenadante con NaOH 1 M, después se dializó contra Tris-HCl 0.05 M pH 7.3 + NaCl 1.7 M a 4°C por 24 h y se volvió a centrifugar a 4,500 rpm por 2 h a 4°C. El sobrenadante nuevamente se neutralizó y se dializó contra Tris-HCl 0.05 M pH 7.3 + NaCl 2.5 M durante 24 h a 4°C; se centrifugó en las mismas condiciones y la pastilla resultante (colágena tipo I) se disolvió en un volumen pequeño de ác. acético 0.25 M. Esta solución se liofilizó (Virtis 10146), se repartió en frascos de poca capacidad y se almacenó a -20°C.

3.2.1 PAGE-SDS al 7.5% (Laemmli, 1970)

La pureza de la colágena tipo I extraída se comprobó mediante geles de poliacrilamida al 7.5%-SDS colocando diferentes muestras en los pozos del gel (marcadores de peso molecular, colágena tipo I, colágena tipo I comercial y gelatina) empleando una cámara de electroforesis (Bio-Rad HTLV III). El gel concentrador se corrió a 15 mA y el separador a 25 mA. Transcurrida la corrida electroforética, el gel se tiñó toda la noche con azul de Coomassie y al día siguiente se destiñó 1 h con metanol:agua:ác. acético (4:4:1); se secó y se le tomó fotografía (Fig. 1). Las bandas resultantes coinciden con las reportadas para la colágena tipo I (Muñoz y col., 1982; Gadasi y Kessler, 1983; Rosales y Rojkind, 1987).

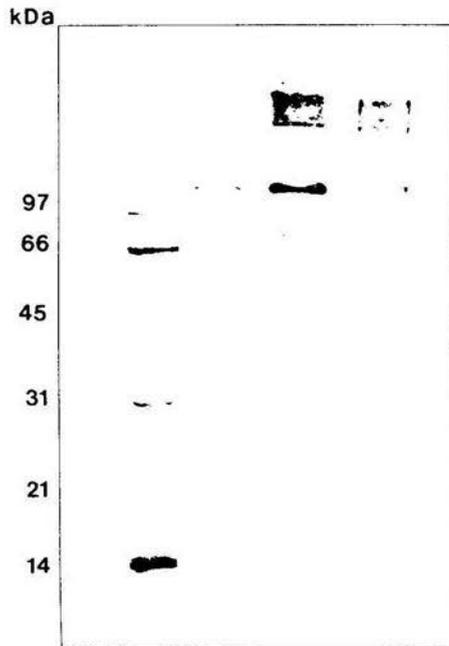


Fig. 1.- Patrón electroforético de colágena tipo I en gel de acrilamida-SDS al 7.5%. (1).- marcadores de peso molecular. (2).- 30 μg colágena tipo I neutralizada extraída de placenta. (3).- 30 μg de colágena tipo I (Sigma). (4).- 30 μg de gelatina (Sigma). En el caso de gelatina se observaron bandas de menor peso molecular que no se encontraban en los carriles de colágena.

3.3 Actividad de Colagenasa (Muñoz y col., 1990)

Para determinar la actividad colagenolítica, se disolvieron 3 mg de colágena tipo I en 1 ml de ác. acético 0.25 M y se dializó 2 h a 4°C contra Tris 0.5 M pH 7.2. Se colocaron 20 µl de esta solución a cada pozo de una caja de 96 pozos (Falcon), la cual se dejó 1 h a 37°C para la polimerización de la película de colágena y 24 h bajo luz UV para su esterilización. A los pozos así preparados se añadieron 175 µl de medio modificado (medio TYI-S-33 sin suero, sin cisteína y sin vitaminas) si en ellos se colocarían trofozoítos axénicos (5×10^4 células/25 µl); o bien 100 µl de Ringer + 75 µl de biftalato de potasio para el caso de amibas provenientes de cultivos mixtos (5×10^4 células/25 µl).

Las cajas se sellaron con papel adherente y se incubaron por 16 h a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio se quitó cuidadosamente por succión con vacío y los pozos se lavaron varias veces con biftalato de potasio frío. Cada pozo se fijó con 200 µl de glutaraldehído al 2.5% en PBS durante 1 h y después se lavó dos veces con glicina 0.1% y dos veces con Tris-HCl 0.05 M pH 7.2. La tinción de la colágena residual en los pozos se hizo añadiendo 150 µl de rojo de sirio al 1% (en ác. pícrico saturado) a cada pozo y se dejó 1 h en agitación suave. Después de este tiempo, los pozos se lavaron tres veces o más con HCl 0.1 N para quitar el exceso de colorante.

El rojo de sirio se eluyó añadiendo 200 µl de metanol-NaOH 0.01% (1:1) y se dejó 1 h en agitación, al término de la cual se tomaron 100 µl de cada pozo, y se adicionaron a eppendorf con 900 µl de agua desionizada para hacer el registro de absorbancias en un espectrofotómetro (Spectronic 1001). La cantidad de colágena residual en los pozos se determinó extrapolando los valores de elución sobre una curva estándar (Junqueira y col. 1979).

3.4 Curva patrón de colágena

Una vez conocida la concentración de proteína por mg del material liofilizado de colágena (0.756 µg), se colocaron volúmenes variables de la colágena disuelta y neutralizada como se describió previamente, a fin de tener de 0 hasta 70 µg de proteína en los pozos. Una vez efectuada la polimerización y tinción de la colágena como se describió, se eluyó el colorante y se graficó la concentración de proteína en los pozos contra la absorbancia registrada (Fig. 2).

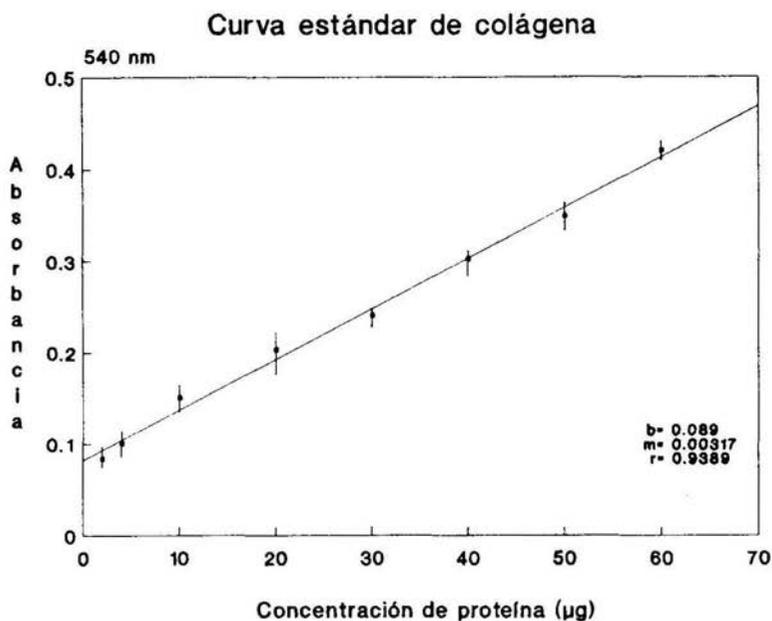


Fig. 2.- Curva estándar de la concentración de colágena. En ella se determinó la cantidad de colágena residual en los pozos después de haber incubado las cepas amibianas sobre películas con 60 µg de proteína/pozo. El cálculo se hizo por extrapolación de los valores de absorbancia registrados.

3.5 Separación de amibas de cultivos polixénicos en gradientes de percoll (Avron y col., 1983)

Las amibas con 48 h de incubación se despegaron del medio por propulsión suave del mismo medio sobre las paredes del matraz y el sustrato de agar ayudados por una pipeta Pasteur. Las amibas se colectaron en un tubo Falcon, se filtraron con fibra de vidrio y se lavaron dos veces con biftalato de potasio. Esta suspensión celular se centrifugó a 1,200 rpm por 5 min, la pastilla se resuspendió en 1 ml de biftalato y se transfirió a un tubo de policarbonato conteniendo un gradiente de percoll (Ver 3.5.1).

Una vez colocadas las amibas en el gradiente, se centrifugaron a 1,900 rpm por 15 min; los diferentes anillos resultantes fueron separados en tubos de ensaye estériles. Cada una de estas bandas se lavó con biftalato y se observó al microscopio. Aquellas bandas en las que se detectaron amibas, se lavaron dos veces y se resuspendieron en el volumen adecuado para tener 5×10^4 células/ μ l por pozo. El sobrenadante de cada banda se tomó como control para las poblaciones amibianas respectivas.

3.5.1 Gradientes de percoll-biftalato 1X

Se hizo una mezcla de percoll-biftalato 10 X (9:1) la cual se tomó como el 100% y a partir de ella se preparó 1 ml de percoll-biftalato 1X al 100%, 80%, 60%, 50%, 30%, 20% y 10%. La mezcla al 100% se colocó al fondo del tubo de gradiente y sobre ella se colocaron las restantes soluciones de forma tal que la solución al 10% quedara en la parte superior.

IV RESULTADOS

4.1 Patrón isoenzimático de cepas de *Entamoeba histolytica* mantenidas en medio polixénico.

Las siguientes figuras (3a-3h) muestran las bandas isoenzimáticas observadas en las cepas amibianas presentes para cada una de las enzimas propuestas para los estudios de zimodemos, los cuales se practicaron por duplicado.

En cada uno de estos sistemas enzimáticos se muestra un carril en el cual se puso la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* para ser empleado como control positivo de cepa patógena; mientras que en otro carril se muestra el patrón de isoenzimas de la cepa Laredo de *E. histolytica* y se utilizó como referencia de un patrón no patógeno, aunque realmente esta cepa, por otros estudios, tiene más relación con *E. moshkovskii* (Meza y col., 1986; Meraz y col., 1986).

Las bandas enzimáticas amibianas que se describen se refieren a aquellas resultantes de la comparación y eliminación, en algunos casos, con las bandas compartidas por cada cepa con su respectivo control bacteriano. Dicho control está representado por un solo carril en las figuras de isoenzimas (carril 1, Fig. 3a-h).

4.1.1 ENZIMA MALICA (MA)

El patrón electroforético de las isoenzimas reveladas para esta enzima mostró una sola banda para todas las cepas amibianas aisladas; la cual corresponde a aquella mostrada por la cepa axénica de HM1:IMSS (carril 14 Fig. 3a, carril 15 Fig. 3b). La posición electroforética de esta enzima nos indica que todas las cepas caracterizadas pertenecen a la especie *Entamoeba histolytica* (Sargeant y col., 1980).

4.1.2 ENZIMA HEXOCINASA (HK)

A excepción de tres cepas de cultivo mixto (56, 56-4 y 16, carriles 11, 12 y 13 Fig. 3c) y de la cepa HM1:IMSS (carril 14 Fig. 3c), todas las cepas restantes provenientes de medios polixénicos y la cepa axénica Laredo, mostraron las dos bandas características de esta enzima en geles de poliacrilamida en gradiente (Meza y col., 1986) con un corrimiento electroforético menor en comparación con aquel observado para la cepa HM1:IMSS (Fig. 3c y 3d, carriles con la marca de cepas no

patógenas). En vista de que un corrimiento electroforético mayor de esta enzima se considera como uno de los marcadores metabólicos para distinguir cepas patógenas de las no patógenas (Farri y col., 1980) se puede considerar que en su mayoría, las cepas amibianas aisladas muestran un patrón no patógeno para esta enzima.

4.1.3 ENZIMA FOSFOGLUCOMUTASA (PGM)

El criterio de patogenicidad para esta enzima es la ausencia de una banda α y la presencia de una banda β . En algunas de las cepas aisladas que se examinaron se observó la presencia de una sola banda, la cual puede considerarse como la banda α al compararse con las bandas mostradas por HM1:IMSS (carril 14 Fig. 3e y carril 15 Fig. 3f). La cepa 16 (carril 13 Fig. 3e) compartió la posición de la banda con la de HM1:IMSS.

4.1.4 ENZIMA GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA (GPI)

La cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* mostró sólo una banda isoenzimática para esta enzima. En las cepas provenientes de cultivos mixtos y en la cepa Laredo se observó un corrimiento electroforético un poco menor que la banda de HM1:IMSS (carril 14 Fig. 3g y carril 15 Fig. 3h). En algunas cepas polixénicas se observó la presencia de algunas otras bandas menos intensas pero se les puede discriminar al observar que comparten la posición con el carril de control bacteriano.

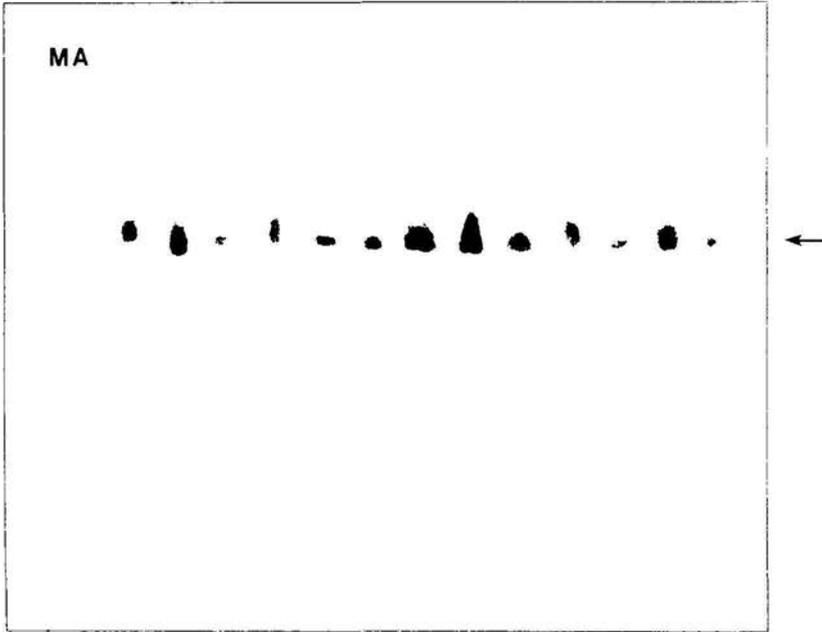


Fig. 3a.- Patrón isoenzimático para la enzima mállica de cepas de *E. histolytica* provenientes de pacientes. (1).-control bacteriano. (2).-cepa Laredo de *E. histolytica*. (3).-cepa 2. (4).-cepa 4. (5).-cepa 7. (6).-cepa 7-3. (7).-cepa 7-4. (8).-cepa 10. (9).-cepa 11. (10).-cepa 56-3. (11).-cepa 56. (12).-cepa 56-4. (13).-cepa 16. (14).-cepa HMI:IMSS de *E. histolytica*. La banda característica de la especie está indicada por una ←. **MA:** mállica.

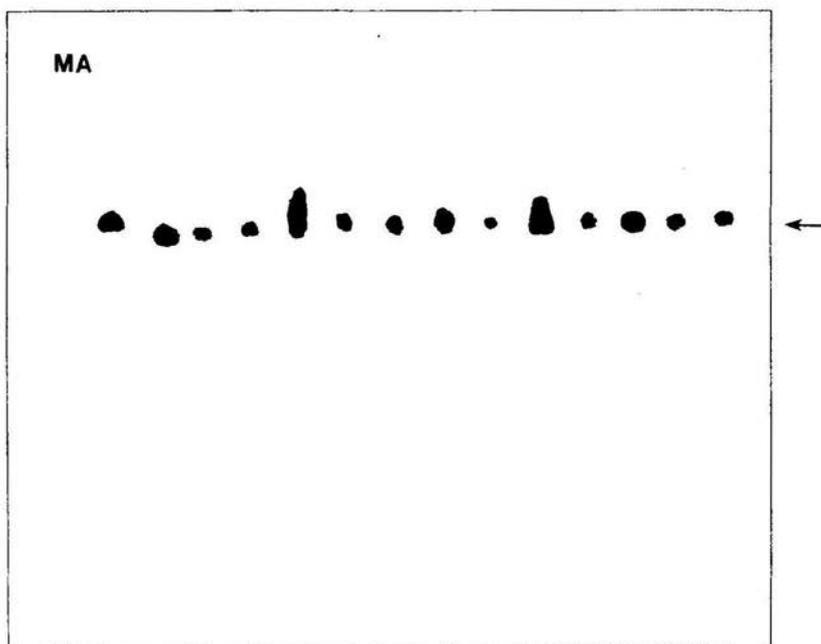


Fig. 3b.- Patrón isoenzimático para la enzima mállica de cepas de *E. histolytica* provenientes de pacientes. (1).-control bacteriano. (2).-cepa Laredo de *E. histolytica*. (3).-cepa 12. (4).-cepa 13. (5).-cepa 13-3. (6).-cepa 13-4. (7).-cepa 14. (8).-cepa 15. (9).-cepa 15-3. (10).-cepa 15-4. (11).-cepa 21. (12).-cepa 24. (13).-cepa 26. (14).-cepa 65. (15).-cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*. La banda característica de la especie está indicada por una ←.

MA: mállica.

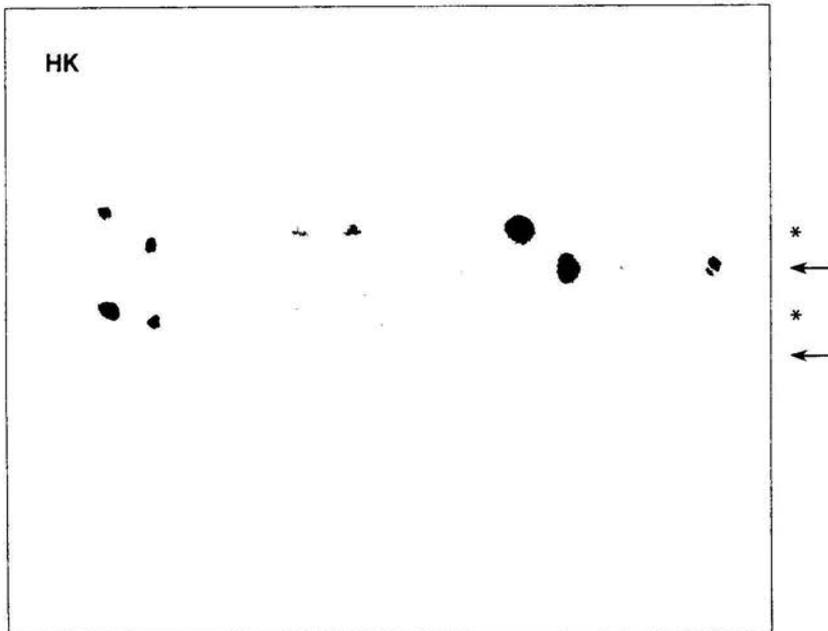


Fig. 3c.- Patrón isoenzimático para la enzima hexocinasa de cepas de *E. histolytica* provenientes de pacientes. (1).-control bacteriano. (2).-cepa Laredo de *E. histolytica*. (3).-cepa 2. (4).-cepa 4. (5).-cepa 7. (6).-cepa 7-3. (7).-cepa 7-4. (8).-cepa 10. (9).-cepa 11. (10).-cepa 56-3. (11).-cepa 56. (12).-cepa 56-4. (13).-cepa 16. (14).-cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*. Las bandas características de cepas no patógenas de *E. histolytica* se indican por un * y las bandas de cepas patógenas por una ←.

HK: hexocinasa.

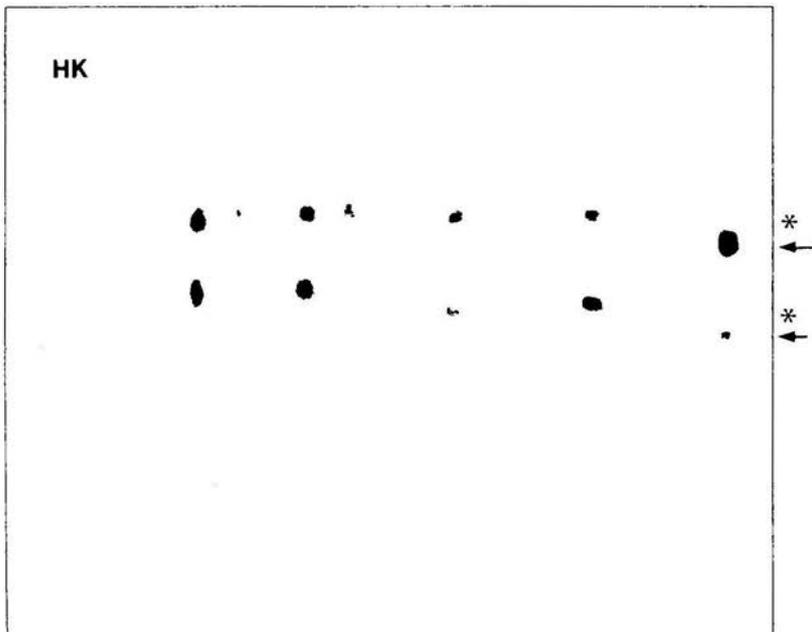


Fig. 3d.- Patrón isoenzimático para la enzima hexocinasa de cepas de *E. histolytica* provenientes de pacientes. (1).-control bacteriano. (2).-cepa Laredo de *E. histolytica*. (3).-cepa 12. (4).-cepa 13. (5).-cepa 13-3. (6).-cepa 13-4. (7).-cepa 14. (8).-cepa 15. (9).-cepa 15-3. (10).-cepa 15-4. (11).-cepa 21. (12).-cepa 24. (13).-cepa 26. (14).-cepa 65. (15).-cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*. Las bandas características de cepas no patógenas de *E. histolytica* se indican por un * y las bandas de cepas patógenas por una ←.

HK: hexocinasa.

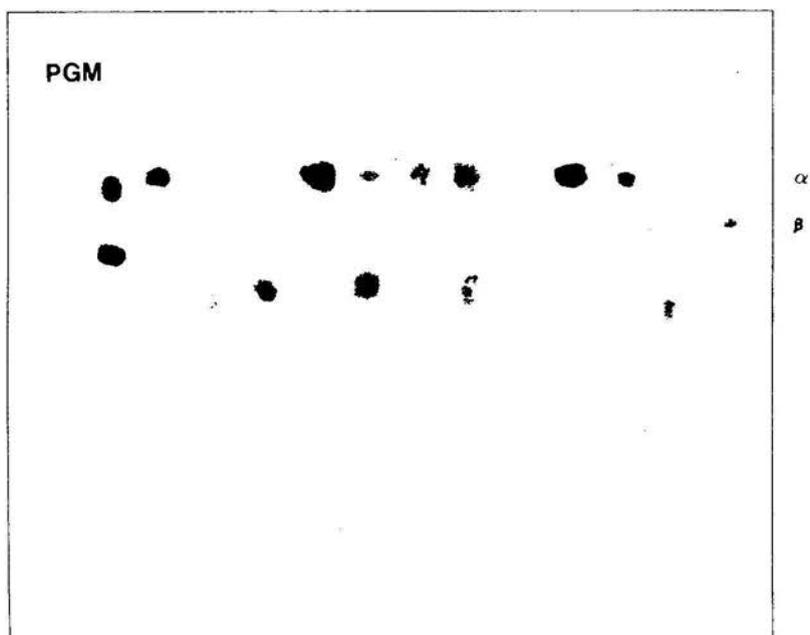


Fig. 3e.- Patrón isoenzimático para la enzima fosfoglucomutasa de cepas de *E. histolytica* provenientes de pacientes. (1).-control bacteriano. (2).-cepa Laredo de *E. histolytica*. (3).-cepa 2. (4).-cepa 4. (5).-cepa 7. (6).-cepa 7-3. (7).-cepa 7-4. (8).-cepa 10. (9).-cepa 11. (10).-cepa 56-3. (11).-cepa 56. (12).-cepa 56-4. (13).-cepa 16. (14).-cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*. Las bandas características de cepas no patógenas de *E. histolytica* son denominadas α y las bandas de cepas patógenas se denominan β .

PGM: fosfoglucomutasa.

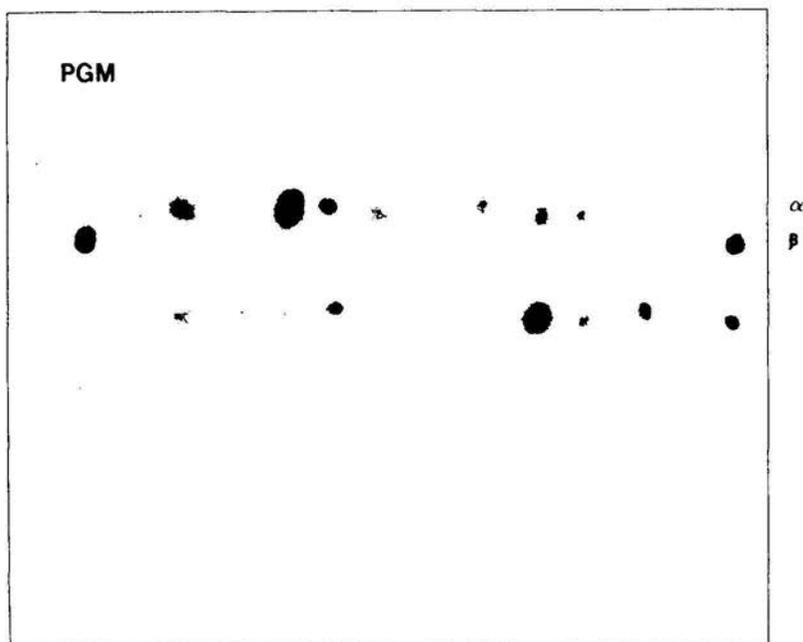


Fig. 3f.- Patrón isoenzimático para la enzima fosfoglucomutasa de cepas de *E. histolytica* provenientes de pacientes. (1).-control bacteriano. (2).-cepa Laredo de *E. histolytica*. (3).-cepa 12. (4).-cepa 13. (5).-cepa 13-3. (6).-cepa 13-4. (7).-cepa 14. (8).-cepa 15. (9).-cepa 15-3. (10).-cepa 15-4. (11).-cepa 21. (12).-cepa 24. (13).-cepa 26. (14).-cepa 65. (15).-cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*. Las bandas características de cepas no patógenas de *E. histolytica* son denominadas α y las bandas de cepas patógenas se denominan β .

PGM: fosfoglucomutasa.

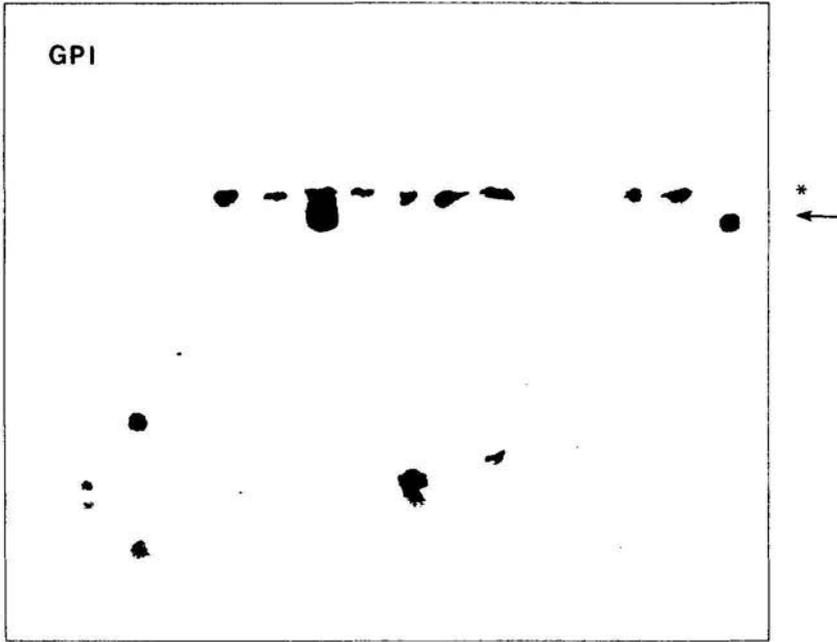


Fig. 3g.- Patrón isoenzimático para la enzima glucosa fosfato isomerasa de cepas de *E. histolytica* provenientes de pacientes. (1).-control bacteriano. (2).-cepa Laredo de *E. histolytica*. (3).-cepa 2. (4).-cepa 4. (5).-cepa 7. (6).-cepa 7-3. (7).-cepa 7-4. (8).-cepa 10. (9).-cepa 11. (10).-cepa 56-3. (11).-cepa 56. (12).-cepa 56-4. (13).-cepa 16. (14).-cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*. Las bandas características de cepas no patógenas de *E. histolytica* se indican por un * y las bandas de cepas patógenas por una ←.

GPI: glucosa fosfato isomerasa.

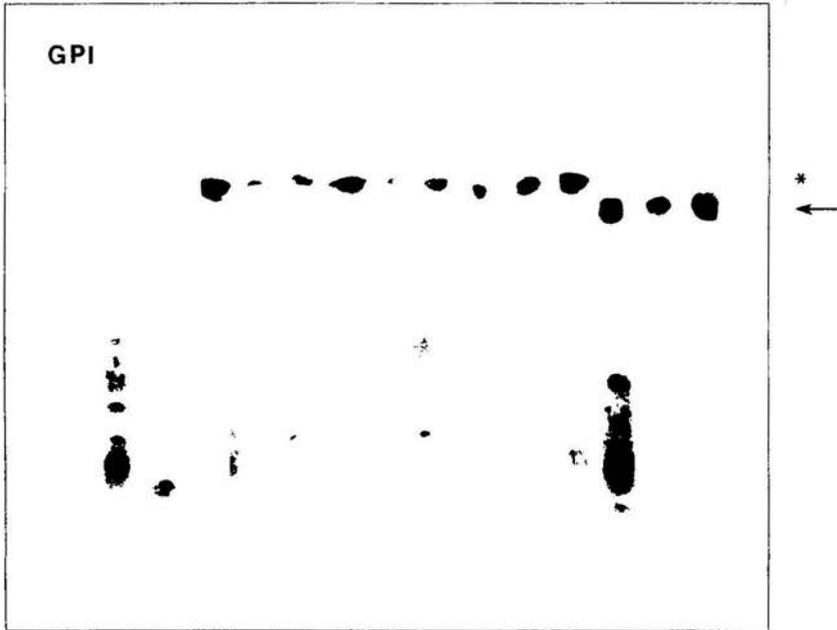


Fig. 3h.- Patrón isoenzimático para la enzima glucosa fosfato isomerasa de cepas de *E. histolytica* provenientes de pacientes. (1).-control bacteriano. (2).-cepa Laredo de *E. histolytica*. (3).-cepa 12. (4).-cepa 13. (5).-cepa 13-3. (6).-cepa 13-4. (7).-cepa 14. (8).-cepa 15. (9).-cepa 15-3. (10).-cepa 15-4. (11).-cepa 21. (12).-cepa 24. (13).-cepa 26. (14).-cepa 65. (15).-cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*. Las bandas características de cepas no patógenas de *E. histolytica* se indican por un * y las bandas de cepas patógenas por una ←.

GPI: glucosa fosfato isomerasasa.

4.2 Actividad colagenolítica en cepas de cultivos polixénicos

La actividad colagenolítica de las cepas examinadas, incluyendo las bandas resultantes en aquellas cepas que presentaron más de una banda amibiana, se muestra en la siguiente gráfica (Fig. 4); en la cual se introdujo la cepa HM1:IMSS como control positivo y a la cepa Laredo como control negativo del efecto degradatorio de la película de colágena.

Los pozos a los cuales solo se añadió el sobrenadante de las pastillas amibianas fueron considerados como los controles de degradación bacteriana para cada cepa. Los valores mostrados en la figura, denotan la actividad colagenolítica presente en 5×10^4 trofozoitos, sustrayendo los valores de Unidades de colagenasa de los respectivos controles bacterianos. Los ensayos de colagenasa se hicieron por triplicado.

Es importante definir que una *Unidad de colagenasa* se refiere a la actividad enzimática necesaria para degradar $1 \mu\text{g}$ de colágena en un minuto a 37°C .

4.3 Tipo de zimodemo y actividad colagenolítica

En la Tabla 3 se muestra el tipo de zimodemo (patógeno o no patógeno) presente en cada una de las cepas examinadas, así como las Unidades de Colagenasa que se determinaron en los ensayos de actividad colagenolítica. Las Unidades de Colagenasa reportados en dicha tabla están dadas considerando la actividad de colagenasa presente en los pozos tomados como control bacteriano.

Actividad colagenolítica en cultivos mixtos de *Entamoeba histolytica*

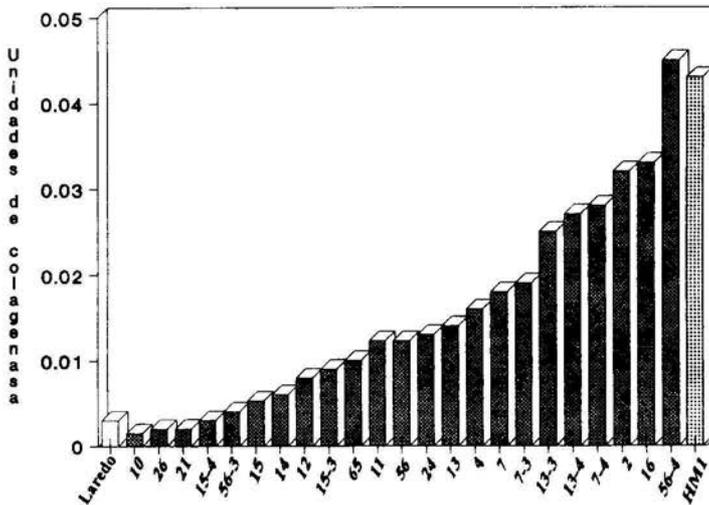


Fig. 4.- Actividad colagenolítica determinada en cepas de *E. histolytica* aisladas de pacientes. A los extremos de la figura se localizan las cepas Laredo y HM1:IMSS de *E. histolytica* como controles de actividad de colagenasa. El aislado 56-4 mostró una actividad mayor que la cepa HM1:IMSS.

Tabla 3. Tipo de zimodemo y actividad de colagenasa determinados en cepas de *Entamoeba histolytica* axénicas y polixénicas.

Cepa	Zimodemo	Unidades de colagenasa
HM1:IMSS	Patógeno	0.0430
2	No patógeno	0.0315
4	"	0.0161
7	"	0.0181
7 - 3	"	0.0190
7 - 4	"	0.0280
10	"	0.0022
11	"	0.0121
12	"	0.0078
13	"	0.0137
13 - 3	"	0.0250
13 - 4	"	0.0271
14	"	0.0061
15	"	0.0053
15 - 3	"	0.0088
15 - 4	"	0.0033
16	Patógeno	0.0333
21	No patógeno	0.0024
24	"	0.0133
26	"	0.0021
56	Mixto	0.0123
56 - 3	No patógeno	0.0036
56 - 4	Mixto	0.0450
65	No patógeno	0.0097
Laredo	"	0.0032

V Análisis y discusión de resultados

Una explicación ante la disparidad entre el número de portadores asintomáticos de quistes amibianos y aquellos individuos con la sintomatología de la enfermedad, es que los primeros están infectados por cepas no patógenas de *Entamoeba histolytica* y los segundos por una especie diferente o cepa patógena de este protozooario (Sargeant y col., 1978).

El análisis de las movilidades electroforéticas de algunas enzimas glicolíticas de este protozooario es considerado como uno de los mejores métodos para determinar el carácter patógeno o no patógeno entre varias cepas de *E. histolytica* (Sargeant y col. 1978; 1980a). Al someter las muestras aisladas de pacientes al proceso para determinar su patogenicidad mediante zimodemos, en primer lugar se comprobó, mediante la enzima málica (MA), que las muestras proporcionadas efectivamente pertenecían a la especie de *E. histolytica* (Fig. 3a y 3b). Por otra parte, entre dichas muestras se encontraron dos cepas (16 y 56-4) que se consideraron patógenas en base a la mayor migración de las bandas detectadas para la enzima HK (Fig. 3c), a la ausencia de una banda α y la presencia de una banda β en la enzima PGM (Fig. 3e); y un corrimiento mayor en la banda de GPI (Fig. 3g). El resto de las cepas examinadas mostraron un patrón no patógeno en su zimodemo al ser comparadas con aquel que mostró la cepa HM1:IMSS (Fig. 3c-3h).

Haciendo referencia a estas cepas no patógenas, hay algunos casos interesantes en los que parece haber contradicción entre el tipo de zimodemo y la actividad colagenolítica que presentan. La cepa 56 muestra un patrón isoenzimático para HK en el que se observaron tanto las bandas de corrimiento rápido, como una banda de corrimiento lento (carril 11, Fig. 3c). Primeramente se eliminó la posibilidad de que alguna de estas bandas perteneciera a las bacterias, encontrando que no comparten ninguna de estas bandas (carril 1, Fig. 3c). En un inicio, este hecho fue desconcertante ya que no ha sido reportado ningún caso en el cual exista una mezcla de zimodemos patógenos y no patógenos en un solo hospedero (Sargeant, 1985; Sargeant y col., 1982b). Sin embargo, al pasar los trofozoitos de esta cepa por un gradiente de percoll, fue posible separar dos subpoblaciones, cada una de las cuales mostró una actividad colagenolítica muy diferente (Tabla 3). Por un lado, la cepa 56-3 tuvo un valor de actividad colagenolítica de 0.0036, mientras que el de la cepa 56-4 fue muy superior (0.0450 U.C.). Estos datos parecen concordar con el zimodemo encontrado posteriormente para la cepa 56-3, pero en la cepa 56-4 siguió hallándose

un zimodemo compuesto.

Por otra parte, en la tabla 3 se hacen notar las cepas 2, 7-4, 13-3 y 13-4; ya que en ellas se presentó un zimodemo no patógeno y un valor de colagenasa relativamente elevado (0.0315, 0.0280, 0.0250 y 0.0271 respectivamente). Estos resultados pueden ser explicados en parte por la forma en la cual se obtuvieron los trofozoítos tanto para el análisis isoenzimático como para la determinación de su actividad colagenolítica.

Al establecerse una cepa en el laboratorio, el total de los trofozoítos obtenidos en una resiembra eran pasados a través de un gradiente de percoll y de las bandas amibianas resultantes se obtenía el número de células requerido para los ensayos de colagenasa y el resto era convertido en extracto para su electroforesis. Sin embargo, en algunas ocasiones el rendimiento celular sólo era suficiente para realizar uno de los ensayos y el faltante se realizaba en la siguiente cosecha de amibas. Esto es muy importante si se considera que dependiendo del tiempo en el que se mantiene alguna cepa amibiana en el medio de Robinson, puede irse relegando la flora bacteriana nativa de la muestra y se va estableciendo la cepa con la que se inocula el medio (*Escherichia coli* B). Esta prevalencia de algún tipo bacteriano puede ejercer un efecto sobre determinada subpoblación amibiana, al estar modificando las condiciones de potencial rédox, condiciones aeróbicas, etc. importantes para el crecimiento del parásito (Jacobs, 1941; Hartley y col., 1979). Además, Mirelman (1987) ha descrito que el medio de Robinson es un sistema en el cual las muestras son mantenidas en presencia de algún tipo de antibiótico para suprimir el crecimiento de la flora que acompaña a las heces, y se adiciona una cepa bacteriana en particular; todo lo cual parece favorecer el crecimiento amibiano aparentemente sin causar ningún cambio en el zimodemo; pero que indudablemente estas nuevas condiciones de crecimiento son bastante selectivas para las amibas.

Los resultados hasta ahora analizados sugieren la posibilidad de que en algunos portadores de *E. histolytica* puedan co-existir subpoblaciones amibianas con un comportamiento patógeno diferente, lo cual puede encontrar apoyo en algunas observaciones realizadas por Bos (1976), Mirelman (1987), Tachibana y col. (1990) y Magos y col. (1989) cuyos resultados proponen que un aislado amibiano puede estar compuesto por subpoblaciones de individuos virulentos y avirulentos con diferencias en su potencial patógeno.

Al seguir analizando la tabla 3, podemos observar que en las bandas de las cepas 7 y 13 se encontró un zimodemo no patógeno, en contraste con un valor de colagenasa alto que en ellas se determinó. Una probable explicación puede darse si se

asume que dichos aislados estaban compuestos en su mayoría por individuos no patógenos y una minoría de organismos patógenos (cepas 7-4, 13-3 y 13-4), la cual podría haber pasado desapercibida en el análisis isoenzimático (Tachibana y col., 1990) pero que fue posible detectar en los ensayos de colagenasa. El recurrir a esta explicación también puede estar apoyado en el hecho de que se han aislado cepas cuyo zimodemo es no patógeno, pero que fueron obtenidas a partir de pacientes con síntomas intestinales (Nozaki y col., 1990). Esto es un indicio de que si bien el potencial patógeno de varias cepas de amibas puede ser detectado por sus respectivos zimodemos, dicha identificación no es suficiente para explicar el proceso de la enfermedad, por lo que deben acompañarse de datos adicionales que determinen el grado de virulencia de las cepas.

La prevalencia de zimodemos no patógenos y de valores de actividad colagenolítica bajos, sobre aquellos casos con zimodemo patógeno y gran actividad de colagenasa que en este estudio se reporta, parece ser reflejo del predominio de portadores asintomáticos sobre aquellos casos con amibiasis invasiva (Walsh, 1988). Esto nos puede sugerir que la mayoría de las cepas con que se trabajó pueden caracterizarse como no patógenas; considerando además la dificultad que se presentó para su establecimiento en el laboratorio. A este respecto se ha descrito que no todos los aislados de *E. histolytica* pueden ser axenizados y varias de esas cepas, especialmente aquellas obtenidas de portadores asintomáticos, requieren de la presencia de cepas bacterianas específicas (presentes en las heces) para su crecimiento *in vitro* (Diamond, 1982); pues se ha reportado que los trofozoítos son muy selectivos en sus interacciones con diferentes especies bacterianas y sólo aquellas que presenten características de reconocimiento específicas pueden favorecer el crecimiento de las amibas (Bracha y col., 1982; Bracha y Mirelman, 1984). De hecho, un problema importante dentro de la amibiasis ha sido la imposibilidad de aislar cepas de portadores asintomáticos en condiciones axénicas (Martínez-Palomo, 1989).

Por otra parte, el contar con un número pequeño de zimodemos patógenos puede coincidir con la situación presente en los trabajos iniciales de Sargeant (1979), en los cuales no había una caracterización clínica adecuada a la que se sometieron las muestras de los pacientes. En este caso no se cuenta con un historial clínico completo y específico de los pacientes en los Hospitales de los cuales se obtuvieron las muestras (Hospital Infantil y Hospital Juárez, México D.F.). En 1982, Sargeant reporta que de 115 infecciones de *E. histolytica* en México sólo el 14%

estuvieron asociadas con zimodemos patógenos.

Estas situaciones nos llevan a pensar en la necesidad que hay para el desarrollo de estudios con fines diagnósticos de la amibiasis invasiva ya que la interpretación de los datos resultantes de los análisis coproparasitológicos se ve limitada porque la sensibilidad de las técnicas usadas es variable dependiendo de la probabilidad de que un individuo infectado pueda ser detectado en un solo examen. Además, hay que considerar que la emisión de quistes es intermitente y que la mayoría de los estudios incluyen una sola muestra de materia fecal, reportándose que se requieren más de seis muestras para la identificación del 80% de los individuos infectados. Un aspecto de relevancia ante casos de diagnóstico comprende al personal encargado de los exámenes; quien en buena medida no está debidamente capacitado. Sargeant y col. (1980b) reportan una frecuencia de casos erróneos diagnosticados del 10.4% en laboratorios clínicos de la Cd. de México. Es en México donde se ha calculado que aproximadamente del 10 al 20% de la población es portadora asintomática de *E. histolytica* (Sepúlveda, 1989).

La mortalidad alcanzada por abscesos hepáticos amibianos en la población mundial alcanza del 2 al 10% (Walsh, 1988); lo cual resalta la importancia de que los individuos afectados por casos invasivos de amibiasis sean detectados oportunamente. Actualmente se presta mucho interés al desarrollo de experimentos con los que se pueda determinar la virulencia amibiana. Recientemente se han propuesto modelos de estudio en animales (Tsutsumi y col., 1988; Martínez-Palomo y col., 1989) o bien ensayos *in vitro* (Bracha y col., 1990; Muñoz y col., 1990) que de alguna manera permiten una delimitación inicial de ciertos factores que pueden intervenir en los mecanismos de la patogenia de la amibiasis.

Las estrategias empleadas en este estudio han permitido la caracterización de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* contenidos en muestras de pacientes. Los resultados obtenidos tanto por el análisis de los patrones isoenzimáticos como por la determinación de la actividad colagenolítica presente en las muestras procesadas, nos llevan a las siguientes conclusiones:

VI Conclusiones

- 1.- De un total de 23 pacientes diagnosticados como positivos para *Entamoeba histolytica* en los hospitales Infantil y Juárez de la Cd. de México; un 90% de las cepas amibianas aisladas presentó un zimodemo no patógeno.
- 2.- Del total de cepas polixénicas aisladas de pacientes, el 26.1% presentó valores de actividad colagenolítica cercanos al determinado para la cepa HM1:IMSS (cepas 2, 7-4, 13-3, 13-4, 16 y 56-4).
- 3.- El potencial patógeno de las cepas examinadas puede estar mejor representado por estudios de actividad colagenolítica
- 4.- Ensayos encaminados a detectar la presencia de colagenasa directamente sobre muestras fecales podrían ser desarrollados con fines diagnósticos
- 5.- Un ensayo de diferenciación de cepas patógenas y no patógenas contribuiría a un mejor diagnóstico de la enfermedad, y por lo tanto a un mejor tratamiento. De esta forma se evitaría la administración de medicamentos tóxicos y que producen efectos colaterales a pacientes con cepas no patógenas.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, E. B., I. N. MacLeod. 1977. Invasive amebiasis. I. Amebic dysentery and its complications. *Medicine (Baltimore)* 56:315-323
- Albach, R. A., T. Booden. 1978. Amoebae. En J. P. Kreier (Ed.) *Parasitic Protozoa Vol. 2*. Academic Press, New York p 455-505.
- Anaya-Velázquez, F., A. Martínez-Palomo, V. Tsutsumi, A. González-Robles. 1985. Intestinal invasive amebiasis: An experimental model in rodents using axenic or monoxenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34:723-730.
- Argüello, C., B. Valenzuela, E. Rangel. 1992. Structural organization of chromatin during the cell cycle of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Arch. Med. Res.* 23:77-80.
- Avron, B., R. Bracha, M. R. Deutsch, D. Mirelman. 1983. *Entamoeba invadens* and *E. histolytica*: Separation and Purification of Precysts and Cysts by Centrifugation on Discontinuous Density Gradients of Percoll. *Exp. Parasitol.* 56:265-269.
- Bhattacharya, S., A. Battacharya, L. S. Diamond. 1988. Comparison of repeated DNA from strains of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27:257-262.
- Blanc, D., R. Nicholls, P. G. Sargeant. 1989. Experimental production of new zymodemes of *Entamoeba histolytica* supports the hypothesis of genetic exchange. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:787-790.
- Boletín Mensual Epidemiología. 1991. Sistema Nacional de Salud (Ed.) Julio 6:97-116.
- Bos, H. J. 1976. An hypothesis about the role of intestinal bacteria in the virulence of *Entamoeba histolytica*. p. 551-557. En: Sepúlveda B. & Diamond, L. S. (Ed.) *Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis*. Centro de Estudios sobre Amibiasis. Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Bos, H. J. 1979. *Entamoeba histolytica*: Cytopathogenicity of Intact Amebae and Cell-free Extracts; Isolation and Characterization of an Intracellular Toxin. *Exp. Parasitol.* 47:369-377.
- Bos, H. J., A. A. Van Den Eijck, P. A. Steerenberg. 1975. Application of ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) in the serodiagnosis of amoebiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69:440.
- Bos, H. J., Van De Griend. 1977. Virulence and toxicity of axenic *Entamoeba histolytica*. *Nature* 265:341

- Bracha, R., L. S. Diamond, J. P. Ackers, G. D. Burchard, D. Mirelman. 1990.** Differentiation of Clinical Isolates of *Entamoeba histolytica* by Using Specific DNA Probes. *J. Clin. Microbiol.* **28**:680-684.
- Bracha, R., D. Mirelman. 1984.** Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites: Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. *J. Exp. Med.* **160**:353-369
- Bracha, R., D. Kobilier, D. Mirelman. 1982.** Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **36**:396-406.
- Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Brady, F. J., M. F. Jones, W. L. Newton. 1943.** Effect of chlorination of water on viability of cysts of *Entamoeba histolytica*. *War. Med.* **3**:409-419.
- Brandt, H., R. P. Tamayo. 1970.** Pathology of human amebiasis. *Hum. Pathol.* **1**:351-385.
- Brumpt, E. 1925.** Etude sommaire de l' *Entamoeba dispar* n. sp. Amibe a Kystes quadrinucléés, parasite de l'homme. *Bull. Acad. Med. (Paris)* **94**:943-952.
- Carrera, G. M., E. C. Faust. 1949.** Susceptibility of the guinea pigs to *Entamoeba histolytica* of human origin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**:647.
- Chadee, K. and E. Meerovitch. 1985.** The pathology of experimentally induced cecal amebiasis in gerbils (*Meriones unguiculatus*). Liver changes and amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* **119**:485
- Chávez, B., A. Martínez-Palomo, M. De la Torre. 1978.** Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de *Entamoeba invadens*, *E. histolytica* y *E. coli*. *Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 Suppl.* **1**:113-116.
- Das, 1977.** Concanavalin A-induced agglutination in pathogenic and non-pathogenic anaerobic and aerobic amoebae. *Int. J. Parasitol.* **1**:5-7.
- De la Torre, M., B. Sepúlveda. 1970.** Avances en los métodos para el cultivo de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1 Suppl.* **1**:9
- Del Moro, R., A. Oliva, P. Herion, R. Capin, L. Ortiz-Ortiz. 1987.** Diagnosis of *Entamoeba histolytica* in feces by ELISA. *J. Clin. Lab. Anal.* **1**:322-325.
- Diamond, L. S. 1982.** A new liquid medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen dwelling protozoa. *J. Parasitol.* **68**:958-959.

Diamond, L. S. B. P. Philips, I. L. Bartgis. 1974. A comparison of the virulence of nine strains of axenically cultivated *Entamoeba histolytica* in hamster liver. *Arch. Inv. Méd. (Méc.) 5 Suppl.* 2:423-426.

Eaton, R. D. P., E. Meerovitch, J. W. Costerton. 1969. A surface active lysosome in *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63:678-680.

Editorial. 1975. Is Flagyl dangerous?. *Med. Lett. Drugs Ther.* 17:53-54.

Editorial. 1974. Warning on diiodohydroxyquin. *Med. Lett. Drugs Ther.* 16:71-72.

Editorial. 1985. Is the ameba harmful or not? *Lancet* i:732-734

Elsdon-Dew R. 1968. The epidemiology of amebiasis. *Adv. Parasitol.* 6:1-62.

Eubank, W. B., R. E. Reeves. 1982. Analog inhibitors for the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of *Entamoeba histolytica* and their effect on culture growth. *J. Parasitol.* 68:599-602.

Farri, T. A., P.G. Sargeant, D.C. Warhurst, J. E. Williams, R. Bhojnani. 1984. Electrophoretic studies of the hexocinase of *Entamoeba histolytica* groups I to IV. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74:672-673.

Gadasi, H., E. Kessler. 1983. Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 39:528-531.

Gadasi, A., D. Kobiler. 1983. *Entamoeba histolytica*: Correlation between Virulence and Content of Proteolytic Enzymes. *Exp. Parasitol.* 55:105-110.

Gahndi, B. M., M. Irshad, T. C. Chawiwa, B. N. Tandon. 1987. Enzyme-linked protein A: an ELISA for detection of amoebic antibody. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81:183-185.

Garfinkel, L. I., M. Giladi, M. Huber, C. Gitler, D. Mirelman, M. Revel, S. Rozenblantt. 1989. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. *Infect. Immun.* 57:926-931.

Ghadirian, E., E. Meerovitch. 1979. Pathogenicity of axenically cultivated *Entamoeba histolytica*, strain 200:NIH, in the hamster. *J. Parasitol.* 65:768

Ghadirian, E., E. Meerovitch. 1984. Lectin-induced agglutination of trophozoites of different species and strains of *Entamoeba*. *Z. Parasitenkd.* 70:147-152.

Gillin, F. D., L. S. Diamond. 1978. Clonal Growth of *Entamoeba histolytica* and other species of *Entamoeba* in agar. *J. Protozool.* 25:539-543.

Guarner, V. 1989. Tratamiento de la amebiasis. En: Martínez-Palomo (Ed.) *Amibiasis*. Editorial Médica Panamericana.

Guerrant, R. L. 1986. The world problem of Amebiasis: Current status, research needs and opportunities for advancement. *Rev. Infect. Dis.* 8:218

Gupta, N. K., C. L. Woodley, R. Fried. 1970. Effect of metronidazole on liver alcohol dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 19:2805-2808.

Hart, C. W., R. F. Naunton. 1964. The citotoxicity of chloroquine phosphate. *Arch. Otolaryngol.* 80:407-412.

Hartley, C. L. C.S. Neumann, M. H. Richmond. 1979. Adhesion of commensal bacteria to the large intestinal wall in humans. *Infect. Immun.* 23:1218-132.

Hartmann, D. P., E. Ghadirian, E. Meerovitch. 1980. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Indirect Hemagglutination Test in Serodiagnosis of Experimental Hepatic Amoebiasis. *J. Parasitol.* 66:344-345.

Hoare, C. A. 1952. The comensal phase of *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* 1:411

Huang, M. T., A. P. Grollman. 1970. Novel inhibitors of protein synthesis in animal cells. *Fed. Proc. Abs.* 29:609

Jacobs, L. 1941. Oxidation-reduction potentials in relation to the cultivation of *Entameba histolytica*. *J. Parasitol* 27:31.

Jarumilinta, R., B. G. Maegraith. 1969. Enzymes of *Entamoeba histolytica* *Bull. Wld. Hlth. Org.* 41:269-273.

Jiménez, F. 1981. Pathology of amebiasis. *Bull. NY Acad. Med.* 57:217

Junqueira, L. C. U., G. Bignolas, R. R. Brentani. 1979. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Anal. Biochem.* 94:96-99.

Kagan, I. G. 1976. Seroepidemiology of amebiasis. p. 574-587 En: Sepúlveda B. & Diamond L. S.(Eds.) *Proceedings on the International Conference on Amebiasis*. Instituto Mexicano del Seguro Social. Méx.

Katzenstein, D., V. Rickerson, A. Braude. 1982. New concepts of amebic liver abscess derived from hepatic imaging, serodiagnosis, and hepatic enzymes in 67 consecutives cases in San Diego. *Medicine (Baltimore)* 61:237-246.

- Kobiler, D., D. Mirelman. 1980.** Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* 29:221-225.
- Kobiler, D., D. Mirelman. 1981.** Adhesion of *Entamoeba histolytica* to monolayers of human cells. *J. Infect. Dis.* 144:539-546.
- Krupp, I. M., S. J. Powell. 1971.** Comparative study of the antibody response in amebiasis. Persistence after successful treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20:421-424.
- Laemmli, U.K. 1979.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
- Laushbaugh, W. B., A. B. Kairalla, J. R. Cantey, A. F. Hofbauer, J. C. Pittman, F. E. Pittman. 1978.** Citotoxicity of a cell free extract of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Inv. Méd. (Méx.)* 9 Supl. 1:233-236.
- López-Revilla, R., S. Said-Fernández. 1980.** Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: hemolytic activity of trophozoite homogenates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29:209-212.
- Magos, M. A., M. De la Torre, M. L. Muñoz. 1989.** Evaluación de la actividad colagenolítica de *Entamoeba histolytica* en cepas de cultivo polixénico. p. 55 XI Seminario sobre Amibiasis. Centro de Estudios sobre Amibiasis. Méx.
- Martínez-Palomo, A., A. González-Robles, B. Chávez, E. Orozco, S. Fernández-Castelo, A. Cervantes. 1985.** Structural Bases of the Cytolytic Mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* 32:166-175.
- Martínez-Palomo, A., I. Meza, B. Chávez, J. L. Rosales-Encina, M. L. Muñoz, A. González-Robles, M. Rojkind. 1987.** *Entamoeba histolytica*: Activation and release of Membrane Dense Bodies. p 371-376 En: K. P. Chang & D. Snary (Eds.), *Host-parasite cellular and molecular interactions in protozoal infections*. NATO ASI Serie, Vol. H 11. Springer-Verlag KG, Berlin.
- Martínez-Palomo, A., A. González-Robles, M. De la Torre, R. de la Hoz. 1974.** Fijación e inclusión *in situ* de *E. histolytica*: aplicaciones en estudios de morfología y citoquímica ultramicroscópica. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 5 Suppl. 2:283-292.
- Martínez-Palomo, A., A. González-Robles, M. De la Torre. 1973.** Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by Con A. *Nature New Bio* 245:186.
- Martínez-Palomo, A. 1982.** The biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press/Wiley. Chichester.
- Martínez-Palomo. 1989.** Biología de la *Entamoeba histolytica* p. 17-41. En: Martínez-Palomo (Ed.) *Amibiasis* Editorial Médica Panamericana.

- Martínez-Palomo, A., V. Tsutsumi, F. Anaya-Velázquez, A. González-Robles. 1989.** Ultrastructure of Experimental Intestinal Invasive Amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **43**:273-279.
- Mathews, H. M., D. M. Moss, G. R. Healy, G. S. Visvesvara. 1983.** Polyacrilamide Gel Electrophoresis of Isoenzymes from *Entamoeba* Species. *J. Clin. Microbiol.* **17**:1009-1012.
- Meraz, M. A., U. Edman, N. Agabian, I. Meza. 1989.** Surface molecules of *Entamoeba histolytica* with immunodominant characteristics. *J. Cell. Biol.* **107**:746a.
- Meraz, M. A., M. De la Garza, M. De la Torre, I. Meza. 1986.** Análisis comparativo de zimodemos de *Entamoeba histolytica* y del género *Entamoeba* en geles de poliacrilamida. *Arch. Invest. Méd. (Méx.) 17 Supl.* **1**:43-49.
- Meza, I., M. De la Garza, M. A. Meraz, B. Gallegos, M. De la Torre, M. Tanimoto, A. Martínez-Palomo. 1986.** Isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* isolates from asymptomatic carriers: use of gradient acrylamide gels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**:1134-1139.
- Minor, R. R. 1980.** Collagen metabolism. *Amer. J. Pathol.* **98**:227.
- Mirelman, D., R. Bracha, P. G. Sargeant. 1984.** *Entamoeba histolytica*: Virulence Enhancement of Isoenzyme-Stable Parasites. *Exp. Parasitol.* **57**:172-177.
- Mirelman, D., R. Bracha, A. Wexler, A. Chayen. 1986.** Changes in Isoenzyme Patterns of a Cloned Culture of Nonpathogenic *Entamoeba histolytica* during Axenization. *Infec. Immun.* **54**:827-832.
- Mirelman, D. 1987.** Ameba-bacterium relationship in amebiasis. *Microbiol. Rev.* **51**:272-284.
- Montalvo, F. E., R. E. Reeves, L. G. Warren. 1971.** Aerobic and anaerobic metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* **30**:249-256.
- Morris, M. N., S. J. Powell, R. Elsdon-Dew. 1970.** Latex agglutination tests for invasive amoebiasis. *Lancet* **i**:1362-1363.
- Muñoz, M. L., E. Lamoyi, G. León, R. Tovar, J. Pérez-García, M. De la Torre, E. Mureuta, R. Bernal. 1990.** Antigens in Electron-Dense Granules from *Entamoeba histolytica* as Possible Makers for Pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2418-2424.
- Muñoz, M. L., M. Rojkind, J. Calderón, M. Tanimoto, S. Arias-Negrete, A. Martínez-Palomo. 1984.** *Entamoeba histolytica*: collagenolytic activity and virulence. *J. Protozool.* **31**:468-470.

- Muñoz, M. L., J. Calderón, M. Rojkind. 1982.** The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **155**:42-51.
- Neal, R. A. 1956.** Proteolytic Enzymes in *Entamoeba histolytica* *Nature* **178**:599.
- Neal, R. A. 1960.** Enzymatic proteolysis by *Entamoeba histolytica*: biochemical characteristics and relationship with invasiveness. *Parasitology* **50**:531.
- Neal, R. A. 1966.** Experimental Studies on *Entamoeba* with special reference to speciation. *Adv. Parasitol.* **4**:1-15.
- Nozaki, T., I. da Silva-Aca, E. Okusawa, M. Megalhães, S. Tateno, T. Takeuchi. 1990.** Zymodemes of *Entamoeba histolytica* isolated in the Amazon and the North-east of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:387-388.
- Oakley, G. P. Jr. 1973.** The neurotoxicity of the halogenated hydroxyquinolines. *J. A. M. A.* **225**:395-397.
- Orozco, E., M. E. Suárez, T. Sánchez. 1985.** Differences in adhesion, phagocytosis and virulences of clones from *Entamoeba histolytica*, strain HM1:IMSS. *Int. J. Parasitol.* **6**:655-660.
- Orozco, E., M. Rodríguez, C. F. Murphy. 1987.** *Entamoeba histolytica*: Cytopathogenicity and lectin activity of avirulent mutants. *Exper. Parasit.* **63**:157.
- Petri, W. A., T. F. H. G. Jackson, V. Gathiram, K. Kress, L. D. Saffer, T. L. Snodgrass, M. D. Chapman, Z. Keren, D. Mirelman. 1990.** Pathogenic and Nonpathogenic Strains of *Entamoeba histolytica* Can Be Differentiated by Monoclonal Antibodies to the Galactose-Specific Adherence Lectin. *Infect. Immun.* **58**:1802-1806.
- Pittman, F. E., M. C. Wetsphal. 1974.** Optic atrophy following treatment with diiodohydroxyquin. *Pediatrics.* **54**:81-83.
- Proctor, E. M., and M. A. Gregory. 1972.** The observation of surface active lysosome in the trophozoites of *Entamoeba histolytica* from the human colon. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **66**:339-342.
- Ravdin, J. I., B. Y. Croft, R. L. Guerrant. 1980.** Cytopathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **152**:377-390.
- Ravdin, J. I., R. L. Guerrant. 1981.** Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **68**:1305-1310.

Ravdin, J. I., R. L. Guerrant. 1982. A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. *Rev. Infect. Dis.* 4:1185-1207.

Ravdin, J. I., C. F. Murphy, R. A. Salata. 1985. N-acetyl-D-galactosamine inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. Partial purification and relation to amoebic virulence *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 151:804.

Ray, K. R. Kumar, L. N. Mohapatra, V. K. Vinayak, A. N. Malaviya. 1974. Indirect fluorescent antibody and indirect haemagglutination test in the serodiagnosis of amoebiasis. *Indian J. Med. Res.* 62:1347-1353.

Ray, D. K., D. K. Chatterjee. 1981. Cecal amoebiasis in albino mice. An experimental model. *Ann Trop. Med. Parasitol.* 75:255

Reeves, R., J. M. Bischoff. 1968. Clasification of *Entamoeba* species By Means of Electrophoretic Properties of Amebal Enzymes. *J. Parasitol.* 54:594-600.

Reinerston, J. W., P. E. Thompson. 1951. Experimental amebic hepatitis in hamsters. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 76:518

Reyes-López, M. E. 1989. Análisis de los cromosomas de *Entamoeba histolytica* con la técnica de electroforesis en gel con alternancia de campos eléctricos. Tesis Licenciatura UNAM pág. 46.

Robert, R., C. Mahaza, C. Bernard, C. Buffard, J. M. Senet. 1990. Evaluation of a New Bicolored Latex Agglutination Test for Immunological Diagnosis of Hepatic Amoebiasis. *J. Clin. Microbiol.* 28:1422-1424.

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

Rojkind, M., P. Ponce-Noyola. 1982. The extracellular matrix of the liver. *Collagen. Rel. Res.* 21:151-175.

Rojkind, M., M. A. Giambrone, L. Biempica. 1979. Collagen Types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterol.* 76:710

Rosales-Encina, J. L., M. Rojkind. 1987. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. p 559-566 En: N. Agabian, H. Goodman & N. Nogueira (Eds.) *Molecular Strategies of Parasitic Invasion*. Alan R. Liss, Inc. USA.

Rustia, M., P. Shubik. 1972. Induction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole. *J. Natl. Cancer Inst.* 48:721-729.

Sargeaunt, P. G., J. E. Williams, J. D. Grene. 1978. The Differentiation of Invasive and Non-invasive *Entamoeba histolytica* by isozyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72:519-521.

Sargeaunt, P. G., J. E. Williams. 1979. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoeba of man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73:225-227.

Sargeaunt, P. G., J. E. Williams, R. A. Neal. 1980 a. A comparative study of *Entamoeba histolytica* (NIH:200, HK9, etc.), "*E. histolytica-like*" and other morphologically identical amoebae using isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74:469-474.

Sargeaunt, P. G., J. E. Williams, J. Kumate, E. Jimenez. 1980 b. The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in Mexico City. A pilot survey I. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74:653-656.

Sargeaunt, P. G., J. E. Williams, R. Bhojnani, J. E. Campos, A. Gómez. 1982 a. The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in a rural and an urban area of Mexico. A pilot survey II. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76:208-210.

Sargeaunt, P. G., J. E. Williams, R. Bhojnani, J. Kumate, E. Jiménez. 1982 b. A review of isoenzyme characterization of *Entamoeba histolytica* with particular reference to pathogenic and nonpathogenic stocks isolated in Mexico. *Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 Supl.* 3:89-94.

Sargeaunt, P. G., T. H. F. G. Jackson, S. R. Wiffen, R. Bhojnani. 1988. Biological Evidence of Genetic Exchange in *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82:862-867.

Sattar, A. B. 1979. An unusual cutaneous amoebic ulcer. *J. Trop. Med. Hyg.* 82:201.

Sawitz, W. G., E. C. Faust. 1942. The probability of detecting intestinal protozoa by successive stool examinations. *Am. J. Trop. Med.* 22:131-136.

Schwartz, D. E., J. Herrero. 1965. Comparative pharmacokinetic studies of dehydroemetine and emetine in guinea pigs using spectrofluorometric and radiometric methods. *Am. J. Trop. Med.* 14:78-83.

Sepúlveda, B. 1982. Amebiasis: host-pathogen biology. *Rev. Infect. Dis.* 4:836-842.

Sepúlveda, B., N. Treviño-García. 1989. Cuadro clínico y diagnóstico de la amebiasis. p. 134-146 En: Martínez-Palomo (Ed.) *Amebiasis* Editorial Médica Panamericana.

Sharma, M., A. Saxena, S. Ghosh, J. C. Samantaray, G. P. Talwar. 1988. A simple and rapid DOT-ELISA dipstick technique for detection of antibodies to *Entamoeba histolytica* in amoebic liver abscess. *Indian J. Med. Res.* 88:409-415.

Simon, M., H. B. Shookhoff, H. Terner, B. Weingarten, J. G. Parker. 1967. Paramomycin in the treatment of intestinal amebiasis, a short course of therapy. *Am. J. Gastroenterol.* **48**:504-511.

Smith, J. M., E. Meerovitch. 1982. *Entamoeba histolytica*: the dynamics of penetrating a meniscus. *Can. J. Zool.* **60**:2124-2128.

Stamm, W. P., M. J. Ashley, K. Bell. 1976. The value of amoebic serology in an area of low endemicity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **70**:49-53.

Stamm, W. P. 1957. The laboratory diagnosis of clinical amoebiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **51**:306-312.

Stone, W. S. 1935. A method of producing encystment in cultures of *Endamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med.* **15**:681-684.

Strachan, W. P., P.L. Chiodini, W. M. Spice, A. H. Moody, J. P. Ackers. 1988. Immunologic differentiation of pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* **i**:561-563.

Tachibana, H., S. Kobayashi, Y. Kato, K. Nagakura, Y. Kaneda, T. Takeuchi. 1990. Identification of a Pathogenic Isolate-Specific 30,000-M_r Antigen of *Entamoeba histolytica* by Using a Monoclonal Antibody. *Infec. Immun.* **58**:955-960.

Tanimoto, M., B. Sepúlveda, J. A. Vázquez-Saavedra, L. Landa. 1971. Lesiones producidas en el hígado del hámster por inoculación de *Entamoeba histolytica* cultivada en medio axénico. *Arch. Invest. Méd. (Méx.) 2 Supl.* **1**:275-284.

Tannich, E., R. D. Hortsman, J. Knobloch, H.H. Arnold. 1989. Genomic DNA Differences between Pathogenic and Nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:5118-5122.

Thompson, P. E., A. Bayles, S. F. Herbest, B. Olszewsky, J. E. Meinsenhelder. 1959. Antiamebic and antitrichomonal studies on the antibiotic paramomycin (humatin) *in vitro* and in experimental animals. *Antibiot. Chemother.* **9**:618-626.

Torian, B. E., S. L. Reed, B. M. Flores, C. M. Creely, J. E. Coward, K. Vial, W. Stamm. 1990. The 96-Kilodalton Antigen as an Integral Protein in Pathogenic *Entamoeba histolytica*: Potential Differences in Pathogenic and Nonpathogenic Isolates. *Infec. Immun.* **58**:753-760.

Treviño-García, M. N., A. Feria-Velazco, I. Ruiz de Chávez, M. De la Torre. 1971. Lisosomas en *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx.) 2 Supl.* **1**:179-186.

Trissi, D., A. Martínez-Palomo, C. Argüello, M. De la Torre, R. de la Hoz. 1977. Surface properties related to concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several *Entamoeba* strains. *J. Exp. Med.* 145:652-665.

Tsutsumi, V., A. Martínez-Palomo, F. Anaya-Velázquez. 1986. Intestinal Invasive Amebiasis: Ultrastructure of the Early Stages During the Development of Mucosal Ulcerations. p 3557 En: Proc. XIth Int. Cong. on Electron Microscopy. Kyoto.

Tsutsumi, V., A. Martínez-Palomo. 1988. Inflammatory Reaction in Experimental Hepatic Amebiasis. *Am. J. Pathol.* 130:112-119.

Tsutsumi, V., R. Mena-López, F. Anaya-Velázquez, A. Martínez-Palomo. 1984. Cellular Bases of Experimental Amebic Liver Abscess Formation. *Am. J. Pathol.* 117:81-91.

Valdez, J., R. Ocadiz, E. Orozco. 1989. Identificación de cromosomas de *Entamoeba histolytica* por electroforesis de campo gradiente. *XI Seminario sobre amibiasis*. Centro de Estudios sobre Amibiasis. Méx. pág. 110.

Villarajos, V. M. 1962. Studies on the pathogenicity of *Entamoeba histolytica* and other amebas species. *Trop. Dis. Bull.* 59:780-781.

Vinayak, V. K., N. L. Chitkara. 1976. Selective ability of *Eentamoeba histolytica* to haemolyse red cells. A preliminary communication. *Indian J. Med. Res.* 64:1443-1445.

Voogd, C. E., J. J. Van der Stel, J. J. Jacobs. 1974. The mutagenic action of nitridazoles. I. Metronidazole, nimorazole, dimetridazole and ronidazole. *Mutat Res.* 26:483-490.

W.H.O. Scientific Working Group. 1980. Parasitic-related diarrhoeas. *Bull. W. H. O.* 58:819-830.

Walsh, J. A. 1988. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. p. 93-105 En: Ravdin J. I. (ed.) *Amebiasis: Human Infection by Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons, Inc., N. Y.

Weinbach, E. C., L. S. Diamond. 1974. *Entamoeba histolytica*: I. Aerobic metabolism. *Exp. Parasitol.* 35:232-243.

Weinbach, E. C. 1981. Biochemistry of enteric parasitic protozoa. *Trends Biochem. Sci.* 6:254-257.

Wittner, M. 1968. Growth characteristics of axenic strains of *Entamoeba histolytica*, Schaudinn, 1903. *J. Protozool.* 15:403-406.

Wolfe, M. S. 1973. Non-dysenteric intestinal amebiasis: Treatment with diloxanide furoate. *Am. J. Med. Assoc.* 224:1601-1604.