

26  
Lej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA

ESTRES POR HIERRO EN *Entamoeba histolytica*  
HM-1:IMSS.

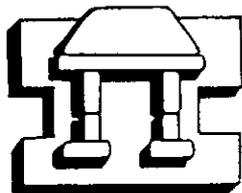
**T E S I S**

PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**JULIAN ARZOLA NIEVES**



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

27 7237



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 laboratorio 52 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la co-tutoría de la Dra. G. Mireya de la Garza y del Dr. J. Jesús Serrano Luna y con la colaboración de la Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera. Esta tesis forma parte del proyecto: Importancia del hierro para *Entamoeba histolytica*, apoyado por el CONACyT (donativo 130M, 1996).

**"Primero pregúntate: ¿Qué he hecho para mi educación? y al adelantar gradualmente, ¿Qué he hecho por mi patria? hasta que llegue el momento en que puedas tener la inmensa dicha de pensar que has contribuido de alguna manera al progreso de la humanidad"**

**LUIS PASTEUR**

## **Dedicatoria :**

Dedico con mucho cariño este trabajo:

A mis padres:

Jaime Elías Arzola Lares (q.p.d.) quien fue un ejemplo de lucha y perseverancia y Elía Nieves por su confianza y gran paciencia, a ambos por ser los responsables de mi existencia y por haberme brindado todo su apoyo y amor.

A mis hermanos:

Leticia, Susana, Jaime y Miguel Angel, quienes siempre me han alentado a seguir adelante, gracias por su apoyo que resultó ser una gran herramienta para alcanzar mi meta.

Con especial cariño a Claudia:

Por ser mi compañera en las buenas y malas.

Para mis amigos:

Joel, Israel, Gerardo, Jorge, Mauricio, Rosita, Araceli, Laura, Eugenia, etc. por su amistad desinteresada.

A la Dra. Mireya de la Garza. A:

Por la dirección y asesoramiento en el presente trabajo, así como por su enorme amistad y por haberme dado siempre la oportunidad de aprender y superarme cada día más.

Al Dr J. Jesús Serrano Luna:

Por la revisión, discusión y recomendaciones en la terminación de esta tesis, así como también por sus enseñanzas y apoyo.

## **Agradecimientos :**

A la ENEP, Campus Iztacala por mi formación.

A la Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera, por la revisión y los comentarios hechos a este trabajo.

Al Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN, donde he podido trabajar en las mejores condiciones.

A mis compañeros del laboratorio 52 de Biología Celular: Alma, Claudia, Magda, Idalia, Jesús, Erasmo, Delfino, Roberto y Esteban, quienes de muchas formas colaboraron para la realización de este trabajo e hicieron muy agradable mi estancia en el laboratorio.

A los sinodales: M. en C. Martha O. Salcedo, Dra. Leticia Moreno Fierros M. en C. Salvador Rodríguez Zaragoza, por sus pertinentes comentarios y recomendaciones para una mejor presentación del trabajo escrito.

Y a todos aquellos que de alguna manera u otra ayudaron a la realización del presente trabajo.

# Indice.

|   |           |
|---|-----------|
| Lista de abreviaturas.....                                    | i         |
| Resumen.....  | ii        |
| <b>I. INTRODUCCION.....</b>                                   | <b>1</b>  |
| <b>A. <i>Entamoeba histolytica</i>.</b>                       |           |
| 1. Ciclo de vida.....   | 2         |
| 2. Epidemiología.....   | 4         |
| <b>B. Hierro.</b>   |           |
| 1. Importancia para los seres vivos.....                      | 5         |
| 2. En la interacción hospedero-parásito.....                  | 6         |
| 3. Hierro e Infección.....                                    | 6         |
| 4. Deficiencia de hierro.....                                 | 7         |
| 5. Toxicidad por hierro.....                                  | 8         |
| <b>C. Antecedentes Directos.</b>                              |           |
| 1. Importancia del hierro para <i>E. histolytica</i> .....    | 11        |
| <b>II. OBJETIVOS.....</b>                                     | <b>15</b> |
| <b>III. MATERIALES Y METODOS.....</b>                         | <b>16</b> |
| 1. Cepa y condiciones de cultivo.....                         | 16        |
| 2. Preparación del material.....                              | 16        |
| 3. Medición de hierro en extractos amibianos.....             | 16        |
| 4. Obtención de extractos amibianos.....                      | 18        |
| 5. Electroforesis de extractos amibianos.....                 | 19        |
| 6. Electrotransferencia.....                                  | 19        |
| 7. Prueba contra anticuerpos anti-actina y anti-hsp70.....    | 19        |
| 8. Determinación de actina-F usando faloidina rodaminada..... | 20        |
| 9. Viabilidad.....  | 20        |
| <b>IV. RESULTADOS.....</b>                                    | <b>21</b> |
| <b>V. DISCUSIÓN.....</b>                                      | <b>30</b> |
| <b>VI. CONCLUSIONES.....</b>                                  | <b>38</b> |
| <b>VII. APÉNDICE.....</b>                                     | <b>39</b> |
| <b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>                                | <b>42</b> |

## Lista de Abreviaturas :

|                   |   |
|-------------------|---|
| CaCl <sub>2</sub> | cloruro de calcio   |
| DTT               | ditiotreitól  |
| E-64              | L-trans-epoxisuccinil-leucilamido (4 guanidino) butano                      |
| EDTA              | ácido etilen diamino tetracético  |
| EGTA              | ácido tetracético de etilén glicol  |
| gr                | gramos  |
| hr                | horas   |
| HCl               | ácido clorhídrico   |
| IA                | iodoacetato   |
| l                 | litros  |
| 2-ME              | 2-mercaptoetanol  |
| M                 | molar   |
| mg                | miligramos  |
| min               | minutos   |
| ml                | militros  |
| mM                | milimolar   |
| MgCl <sub>2</sub> | cloruro de magnesio   |
| NEM               | N-etil-maleimida  |
| nm                | nanómetros  |
| PBS               | amortiguador salino con fosfatos  |
| pH                | potencial de hidrógeno  |
| p-HMB             | para-hidroximercuribenzoato   |
| PMSF              | fenil metil sulfonil floruro  |
| rpm               | revoluciones por minuto   |
| SDS               | dodecil sulfato de sodio  |
| Tris-HCl          | trizma base amortiguado con HCl   |
| TRITC             | isotiocianato de tetrametil rodamina  |
| TYI-S-33          | medio Diamond basal para el cultivo axénico de <i>Entamoeba histolytica</i> |
| μl                | microlitros   |
| μM                | micromolar  |
| ZnCl <sub>2</sub> | Cloruro de zinc   |

## Resumen.

La importancia del hierro (Fe) en los organismos se debe a sus propiedades redox únicas, pues forma el centro activo de enzimas y proteínas hémicas. Sin embargo, el Fe libre puede ser extremadamente tóxico y convertir el oxígeno en especies reactivas ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ) a través de la serie de reacciones de Haber-Weiss, o formar complejos como  $FeO^{2+}$  o  $Fe^{2+}-O-FeO^{3+}$ . Estas especies tóxicas provocan daños a toda clase de macromoléculas biológicas.

El objetivo de este trabajo fue iniciar el conocimiento de la respuesta causada en la amiba debido al estrés generado por falta o exceso de Fe. En cinéticas de crecimiento amibiano en medio Diamond con diferentes concentraciones de Fe, encontramos: ① Que a concentraciones de Fe más bajas al control (100  $\mu M$ ), el crecimiento disminuye considerablemente, así como la disminución general en la expresión de proteínas; en especial un polipéptido de 56 kDa, el cual fue recuperado al adicionar Fe a un medio previamente quelado y la aparición de un polipéptido de 88 kDa. ② Que a concentraciones más altas de 100  $\mu M$  la multiplicación celular en las primeras resiembras se incrementa 2-3 veces más que el control, excepto cuando hay un exceso de Fe (890  $\mu M$ ). En todos los casos sin afectar su viabilidad (95-97%). Se midió la cantidad de Fe total presente en  $1 \times 10^6$  trofozoitos crecidos en cada uno de los medios. Esta cantidad se incrementó proporcionalmente a la cantidad de Fe del medio de cultivo. También se encontró un aumento en la síntesis de proteínas totales en todas las concentraciones probadas, excepto en la de 890  $\mu M$ , en donde disminuyó con respecto al control. Por electroforesis en geles de poliacrilamida se encontró la expresión de un polipéptido de 49 kDa en las concentraciones de 150, 330 y 630  $\mu M$ , mientras que en la concentración de 890  $\mu M$  se expresaron tres polipéptidos de 162, 56 y 40 kDa. Finalmente se observó que concentraciones de Fe por arriba de las óptimas en la amiba, no interfieren en la expresión de actina-F, ni en la morfología. Sin embargo, por debajo de esta concentración se encuentra la actina-F disminuida a la tercera parte, mientras que la morfología cambia al reducir su tamaño y redondearse. Finalmente todos estos datos indican que las amibas presentan cambios según la disponibilidad al hierro.

# I. Introducción.

## A. *Entamoeba histolytica*.

El género *Entamoeba* incluye numerosas especies parásitas de invertebrados y vertebrados. En el caso de amibas que parasitan al hombre se conocen ocho especies pertenecientes a cuatro géneros: *Iodamoeba bütschii*, *Endolimax nana*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba gingivalis* (Neva y Brown, 1994), *Entamoeba hartmanni* (Walter y Devis, 1981; Gonzalez-Ruiz, 1990) y más recientemente la descripción todavía controversial de *Entamoeba dispar*, a pesar de un gran número de pruebas bioquímicas, inmunológicas y genéticas a favor (Diamond y Clark, 1993). Todas estas especies viven en el intestino grueso, excepto *E. gingivalis* que habita en la boca (Neva y Brown, 1994). También hay otros tipos de amibas que raramente se presentan en el hombre como es el caso de *Entamoeba polecki*, un parásito del cerdo (Walter y Devis, 1981) o bien amibas de vida libre como *Naegleria fowleri* (orden Schizopyrenida), que causa meningitis letal en el hombre, generalmente en los nadadores y *Acanthamoeba culbertsoni* (suborden Acanthopodina) que invade mucosa nasal y puede ser letal (Martínez y Gutiérrez, 1991).

Las características diferenciales del género *Entamoeba* que parasitan al hombre están basadas en el número de núcleos presentes en los quistes maduros, el tamaño del quiste y la distribución del glucógeno citoplasmático (González-Ruiz, 1990). En el caso de *E. gingivalis* no se ha reportado ninguna fase quística (Neva y Brown, 1994). En *E. coli* sus quistes tienen un rango de tamaño de 15 a 35  $\mu$  y presentan 8 núcleos, mientras que los quistes de *E. histolytica* y *E. hartmanni* presentan 4 núcleos, sin embargo los quistes de ambas se diferencian en su tamaño ya que los de *E. hartmanni* miden menos de 10  $\mu$  (Neal, 1966). Esto es muy importante, ya que morfológicamente son indiferenciables, aún tomando en cuenta los detalles citoplasmáticos y nucleares finos (González-Ruiz, 1990). De hecho, todavía en 1975 a *E. hartmanni* se le consideraba la "raza pequeña" de *E. histolytica* a pesar de que Burrows (1957) diera una categoría taxonómica propia a *E. hartmanni*.

Una de las principales preguntas en el campo de la amibiasis es por qué el 90% de los portadores son asintomáticos y sólo el 10% presenta sintomatología. Se ha argumentado que son las diferencias en el parásito, en el huésped y en la relación que se establece entre ambos (Martínez-Palomo, 1986; Conde Bonfil, 1994).

Hace tiempo que se estableció la discusión sobre la existencia de subespecies de *E. histolytica* (Sargeant, 1987). Hasta la fecha sigue viva esta discusión, con ejemplos a favor y en contra. 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: ① *E. histolytica* comprende una sola especie de carácter invasivo, cuyas lesiones pueden desencadenar o no manifestaciones clínicas. ② *E. histolytica* es normalmente un comensal que reside en el colon humano, la cual en ocasiones, por razones aún desconocidas se convierte en un patógeno invasivo. ③ *E. histolytica* comprende dos especies morfológicamente idénticas, una de ellas es un patógeno invasivo que exhibe diferentes grados de virulencia y la otra es un patógeno no invasivo que tiene la capacidad de producir erosiones superficiales en la mucosa del colon. Recientes estudios han aportado evidencias tanto bioquímicas, inmunológicas y genéticas (Diamond y Clark, 1993), para poder decir que la tercera hipótesis es la más correcta; con lo cual Brumpt (1925) estaba en lo correcto.

## Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* es relativamente simple si se compara con el de otros patógeno, ya que no han sido encontrados un estadio sexual en las amibas ni en huéspedes intermediarios (Trissl, 1982). *E. histolytica* ha sido observada en heces como trofozoíto, pre-quiste y quiste. La forma resistente al medio ambiente es el quiste, donde el microorganismo puede sobrevivir hasta por dos días a 37 °C y más de 60 días a 0 °C y muere a temperaturas extremas después de 72 hr a temperatura de -28 °C o bien después de 5 minutos a 50 °C (Ravdin y Guerrant, 1982). La pared de los quistes mide entre 125-150 nm de grosor y esta compuesta por elementos fibrilares de 2-3 nm de diámetro, que forman una red compacta, constituida a su vez por varias capas concéntricas (Chávez et al., 1978).

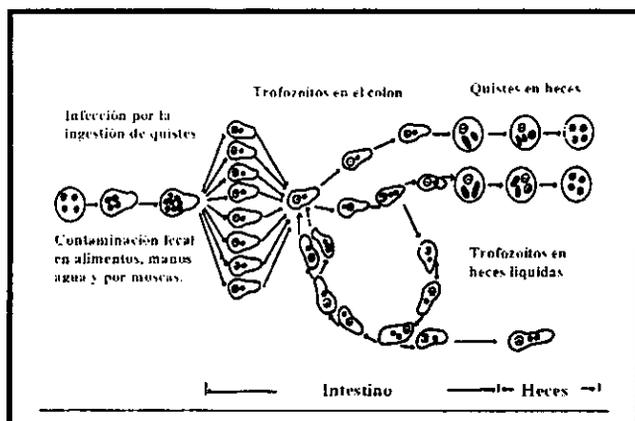


Fig 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.

Los quistes de *E. histolytica* representan la forma infectante de la amiba y los trofozoítos la forma invasora. Cuando los quistes son deglutidos con los alimentos o bebidas contaminadas, reciben la acción de los jugos digestivos que debilitan su pared, se rompen en el intestino delgado y dan lugar a trofozoítos metacíclicos que conservan el mismo número de núcleos que los quistes; después cada núcleo se divide en dos y resulta un segundo trofozoíto metacíclico con 8 núcleos que habita en la luz del colon. Cada núcleo se rodea de una porción de citoplasma y se forman 8 trofozoítos que crecen y se multiplican por división binaria. Los trofozoítos se sitúan en la luz del intestino sobre la superficie de las glándulas de Lieberkun o invaden la mucosa. Este periodo abarca entre 48 hr y 4 meses (Neva y Brown, 1994). El daño intestinal es más frecuente a nivel del ciego y recto-sigmoides, en virtud de que en estos sitios el tránsito intestinal es menor y con ello se concentra el mayor número de trofozoítos, algunos de los cuales llegan a invadir las paredes. En la luz del intestino los trofozoítos eliminan las vacuolas y demás inclusiones intracitoplasmáticas, se inmovilizan y forman quistes que adquieren una cubierta y originan los quistes inmaduros mononucleares, los que continúan su desarrollo hasta los típicos quistes tetranucleados que se eliminan con la materia fecal (Neva y Brown, 1994). Cuando hay diarrea, las amibas son expulsadas al exterior y pueden ser encontradas en evacuaciones fluidas frescas. Si no hay diarrea, las condiciones son más favorables para el enquistamiento.

Como los quistes mantienen su vitalidad por días, el contagio puede ser directo. En el primer caso por las manos contaminadas con las propias heces de la persona infectada que a su vez infectan alimentos, bebidas o manos de otras personas. En el segundo caso, la contaminación fecal por mecanismos diversos, como transmisores biológicos mecánicos; por ejemplo las moscas en las que se han encontrado quistes en las heces, vómitos y cuerpo (Manriquez-Saide, 1997), contaminación del agua para consumo y manejo de utensilios con los que se preparan e ingieren alimentos. Un individuo infectado puede excretar más de 45 millones de quistes por día (Ravdin y Guerrant, 1982). La etapa en la que se puede ser portador varía desde meses hasta 2 años (Gutiérrez y Muñoz, 1991). Sin embargo se puede dejar de ser portador espontáneamente.

## Epidemiología.

La amibiasis es definida como una infección producida por el protozoo parásito *E. histolytica*, el cual se ha estimado que infecta aproximadamente a 500 millones de personas anualmente en el mundo (Walsh, 1986) y solamente cerca del 10% de éstas desarrolla la enfermedad sintomática en la forma de disentería amibiana, absceso hepático amibiano, ameboma, colitis ulcerativa amibiana, apendicitis amibiana y otras manifestaciones poco frecuentes, como infecciones cutáneas, pulmonares y cerebrales (García-Manzo, 1990).

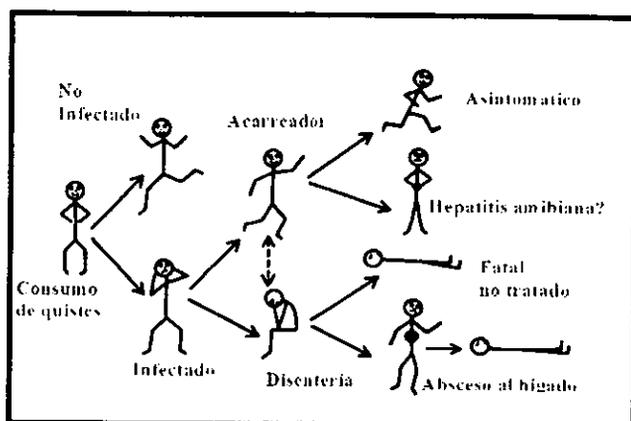


Fig. 2. Amibiasis, y sus diferentes vías de infección.

La amibiasis invasiva produce entre 40 mil y 110 mil muertes por año, siendo la tercera causa de muerte por infecciones de parásitos después de malaria y schistosomiasis (Walsh, 1986). La amibiasis en México es un problema de salud pública cuyas complicaciones afectan en mayor proporción a sujetos del sexo masculino, con mayor frecuencia en edades de los 20-50 años, es decir, en la etapa más productiva de sus vidas (Cerecedo et al., 1996). Sin embargo, en los niños reviste una mayor gravedad, con una tasa de mortalidad que alcanzaba 26.9% hasta antes de 1970 y que para 1983 se redujo alrededor de 2% (Gómez et al., 1995). La amibiasis es una parasitosis frecuente en nuestro medio, se ha evaluado que del 27-30% de la población se encuentra infectada y se calcula que el 1% de ellos muere anualmente a causa de la enfermedad. Su presencia esta directamente relacionada con la higiene y la contaminación fecal del agua y los alimentos (Tay et al., 1996).

La vía más importante de transmisión es ano-mano-boca; los portadores asintomáticos son la forma más frecuente de infección por las amibas, calculándose que hay cinco de ellos por cada individuo sintomático, y que la duración de este estado puede ser de algunos meses hasta dos años; por ello, estos sujetos son la forma más eficaz de diseminación de la amiba, la cual una vez adquirida, generalmente se localiza en el colon, pero a veces puede invadir y ocasionar complicaciones muy severas (Ximénez et al., 1993).

## **B. Hierro.**

### **Importancia del hierro para los seres vivos.**

El hierro o fierro (Fe) es indispensable para la vida, sirve como un metal cofactor para muchas enzimas ya que forma el centro activo de una variedad de enzimas importantes; tales como: ribonucleótido reductasa, aconitasa y succinil deshidrogenasa, así como para proteínas no hémicas y hemoproteínas (Crichton, 1991); en estas últimas el Fe se encuentra insertado como una joya en el centro del grupo proteico hémico. El Fe contenido en proteínas cataliza reacciones clave que involucran el metabolismo energético, respiración y la síntesis del DNA, por está razón el Fe es esencial para prácticamente todas las formas de vida, excepto para algunos lactobacilos (Archibald, 1983).

## El Hierro en la Interacción Hospedero-Parásito.

El Fe libre en el ambiente y dentro de los seres vivos no se encuentra disponible, debido a que su solubilidad es muy baja ( $10^{-18}$  M para el  $\text{Fe}^{+3}$  y  $10^{-8}$  M para el  $\text{Fe}^{+2}$ ) (Williams, 1982), sin embargo el contenido de Fe en biomoléculas dentro del plasma es alto (cerca de  $2 \times 10^{-5}$  M) (Bullen, 1981). Proteínas como la transferrina y lactoferrina que actúan como transportadores específicos de  $\text{Fe}^{+3}$ , limitan el crecimiento de los microorganismos, ya que éstos necesitan de  $10^{-8}$  a  $10^{-6}$  M para sostener su multiplicación. Las ferritinas de animales y plantas almacenan el Fe en una forma no tóxica rodeándolo con una capa de proteína y pueden contener hasta 4500 iones  $\text{Fe}^{+3}$  (Theil, 1987).

Para sobrevivir en un medio ambiente limitado de Fe por el hospedero los microorganismos han desarrollado diversos y elaborados sistemas para obtenerlo, como son:

- ① Producción de moléculas de bajo peso molecular llamadas sideróforos, con alta afinidad por el Fe férrico y que compiten con las proteínas que contienen Fe del hospedero, principalmente transferrina y lactoferrina (Neilands, 1981).
- ② Remoción directa del Fe de las proteínas del hospedero, mediante la interacción de receptores de superficie de los microorganismos (Ogunnariwo y Schryvers, 1990).
- ③ Reducción del Fe férrico y transporte del Fe ferroso (Wooldrige y Williams, 1993).
- ④ Degradación de proteínas que contienen Fe (transferrina, lactoferrina y hemoglobina), por proteasas (Carlsson, 1984).

## Hierro e Infección.

La capacidad de un patógeno para colonizar y proliferar dentro de un nicho ambiental en el hospedero es esencial para la iniciación de una infección. El crecimiento depende en parte de la habilidad del patógeno para obtener los nutrientes esenciales, de éstos, el Fe juega un papel crucial en el establecimiento y progresión de una infección (Wooldrige, 1993).

El Fe participa en las infecciones a través de dos mecanismos, en el primero la toxicidad del Fe debilita el sistema inmune por alteración de las funciones defensivas, ya que actúa como un supresor de la quimiotaxis y la fagocitosis, así como también en la acción microbicida de los leucocitos mononucleares y polimorfonucleares. Además, el exceso de Fe

reduce el número de células secretoras de interleucina-2 y la acción de los macrófagos contra los tumores (Douvas et al., 1993). Un segundo mecanismo por el cual el exceso de Fe aumenta la infección, es porque sirve como un nutriente esencial para los microorganismos invasores (Bullen et al., 1991; Otto et al., 1992).

## **Deficiencia de Hierro.**

### **EN MICROORGANISMOS:**

Se conoce que la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* expresa una proteína de membrana externa de 83 kDa, bajo condiciones de restricción de Fe en su crecimiento (Yamamoto et al., 1995). *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* son bacterias que no producen sideróforos, las cuales pueden invadir el sistema sanguíneo donde el Fe puede ser capturado a partir de transferrina, lactoferrina, hemo y compuestos que contienen hemo, gracias a una familia de distintos receptores reguladores de Fe en sus superficies de membrana (Caroline, 1996). *Bacteroides fragilis* es otra bacteria que no produce sideróforos, pero expresa cuatro proteínas de superficie de las cuales una de 44 kDa se presenta en mayor cantidad bajo estrés de Fe (Otto et al., 1988).

Cuando los microorganismos se encuentran en un medio deficiente en Fe su velocidad de crecimiento disminuye, por lo cual estas tienden a sacrificar cualquier exceso de enzimas que contengan este metal, para continuar creciendo y sobreviviendo. Este es el caso de bacterias aeróbicas facultativas en las cuales se ha observado una disminución dramática de la deshidrogenasa succínica, la catalasa (Winder y O'Hara, 1962), los citocromos (Waring y Werkman, 1944) y la actividad respiratoria (Padmanaban y Sarma, 1965). En casos de deficiencia muy severa se llega a encontrar disminución de la respiración endógena y el metabolismo oxidativo de otros intermediarios del ciclo de Krebs, así como el lactato, piruvato, acetato y formato (Theodore y Shade, 1965).

### **EN EL HOMBRE:**

El Fe disminuye en el organismo por las hemorragias repetidas, por trastornos en el aparato digestivo que dificultan su absorción, o por deficiencias dietéticas. Las hemorragias repetidas pueden ser pequeñas, como en algunos casos de carcinoma del cuello uterino o en

parasitosis intestinales como la uncinariasis o la amibiasis; en estos casos, además de la pérdida de Fe existen también trastornos que dificultan la absorción o que interfieren con la dieta; este último factor es importante, ya que las principales fuentes de Fe son la carne (especialmente el hígado), la fruta y los vegetales, pero además de las costumbres alimenticias, la pobreza, la ignorancia y las parasitosis intestinales desempeñan papeles importantes en la anemia sideropénica (Correa et al., 1980).

Aunque es frecuente observar el déficit de Fe en términos de anemia, de hecho ésta constituye una manifestación tardía y es antecedida por el trastorno en la función de muchas enzimas dependientes de Fe, lo que da lugar a consecuencias clínicas multisistémicas (Robbins, 1990). Las consecuencias del déficit de Fe, van más allá de la aparición de una anemia microcítica hipocrómica. Incluso en ausencia de anemia, estas consecuencias son: ❶ Alteraciones del desarrollo psicomotor, en la actividad intelectual y cambios en la conducta (Lozoff, 1988). También, la deficiencia de Fe puede aumentar el riesgo de saturnismo, sobre todo en niños pequeños, ésto debido a que los pequeños absorben mayores cantidades de plomo (Watson et al., 1986). ❷ Alteraciones en las respuestas inmunológicas frente a las infecciones (Miale, 1985). ❸ Anomalías en la termorregulación (Beard et al., 1984) y ❹ Disminución en la capacidad para realizar cualquier actividad física (Davies et al., 1984).

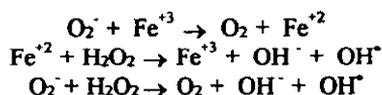
En casos de anemia ferropénica grave pueden observarse a veces glositis, coiloniquia (deformación de las uñas en cuchara), y rara vez, un síndrome asociado a esofagitis membranosa y disfagia conocida como síndrome de Plummer-Vinson. Sin embargo, debemos mencionar que la mayoría de los pacientes con anemia ferropénica son asintomáticos (Stein, 1991).

## Toxicidad por hierro.

A causa de la habilidad del átomo de hierro para generar dos especies iónicas estables, el Fe férrico ( $Fe^{+3}$ ) y el Fe ferroso ( $Fe^{+2}$ ), el hierro actúa como un catalizador en numerosas reacciones biológicas redox de fundamental importancia. Sin embargo, el Fe puede catalizar la formación de radicales libres extremadamente reactivos en presencia de oxígeno y puede disparar reacciones en cadena que son perjudiciales para las biomoléculas (Agarwal y

Sohal, 1994), especialmente provocan daños en las membranas y el DNA, por lo cual es en extremo importante tanto para las células como para el organismo, el mantenimiento de la homeostasis del Fe que asegura el abastecimiento del Fe y previene la acumulación de éste en exceso (Hentze y Kühn, 1996).

El Fe férrico puede ser reducido por aniones superóxido ( $O_2^-$ ) a  $Fe^{+2}$ . El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), formado directamente o con mayor frecuencia por dismutación de aniones superóxido, reacciona entonces con el  $Fe^{+2}$  por la reacción de Fenton para producir radicales hidroxilo ( $OH^*$ ). Esta secuencia que empieza con aniones superóxido y  $Fe^{+3}$ , que conduce a la generación de radicales hidroxilo sin que se consuma el  $Fe^{+3}$ , se llama reacción de Haber-Weiss catalizada por el Fe (Crichton, 1991).



Estos radicales hidroxilo pueden atacar toda clase de macromoléculas biológicas, y pueden despolimerizar polisacáridos (McCord, 1974), causar rompimiento de los filamentos del DNA (Halliwell y Gutteridge, 1992), inactivar enzimas (Zhang et al., 1990) e iniciar peroxidación de lípidos (Gutteridge et al., 1982).

En el hombre, la toxicidad aguda por Fe es una de las formas más frecuentes de intoxicación, sobre todo en los preescolares. La intoxicación grave por Fe se caracteriza por lesión de la mucosa intestinal, que provoca una diarrea sanguinolenta y vómitos, que pueden ir seguidos de acidosis, insuficiencia hepática y choque. Un tratamiento eficaz es el aporte de líquidos y electrolitos para prevenir el choque así como la administración de quelantes de Fe, lo cual ha permitido reducir la mortalidad.

La sobrecarga crónica de Fe es consecuencia, sobre todo, de un trastorno genético, la hemocromatosis, que se caracteriza por el aumento de la absorción del metal, y de enfermedades relativamente raras que exigen frecuentes transfusiones como sucede en la talasemia y la anemia aplásica. El exceso de Fe aparentemente influye en el desarrollo de cardiomiopatía, artropatía, así como en varias enfermedades endócrinas y en neoplasias (Weinberg, 1990). Pacientes con episodios de hepatitis, malaria u otras enfermedades

hemolíticas, desarrollan hiperferremia, la cual frecuentemente resulta en muchas infecciones como salmonelosis sistémica (Weinberg, 1993).

Los sitios de infección tienden a ser asociados con los sitios de exceso de Fe, como ejemplos tenemos: ❶ El desarrollo de sarcomas en los sitios de inyección intramuscular del metal, ❷ carcinomas hepatocelulares primarios en hemocromatósicos y pacientes alcohólicos, en los cuales sus hígados se encuentran sobrecargados con Fe, ❸ cáncer colorectal en pacientes que tienen Fe excesivo en el lumen y/o mucosa del colon y ❹ neoplasias en el tracto respiratorio en personas con exceso en la cantidad de Fe inhalado (Weinberg, 1993).

Por otro lado, las células eucariotas como las procariotas usan elaborados sistemas regulatorios para controlar los niveles de Fe intracelular, los reguladores maestros en estos sistemas son proteínas cuya actividad es gobernada a través del contenido de Fe, como en el caso de la proteína Fur en procariotes (Neilands, 1994) o las proteínas de respuesta al Fe en células de mamífero llamadas IRP-1 (Hentzne y Kuhn, 1996). Otras proteínas reguladoras de Fe son las Fnr de *Escherichia coli*, las cuales responden a la presencia de oxígeno (Beinert y Kiley, 1996). Tanto Fnr como IRP-1 contienen grupos [4Fe-4S], los cuales han sido recientemente llamados biosensores de oxidantes y de Fe (Tracey y Klausner, 1996).

Normalmente las células y los tejidos están protegidos contra los radicales libres oxidantes por diferentes mecanismos como pueden ser las vitaminas, los antioxidantes o los minerales (Laurence y Bendich, 1987). En el caso de bacterias patógenas se cuenta con la sobreexpresión de enzimas que detoxifican estos radicales libres, o bien las bacterias pueden eludir los efectos tóxicos de antibióticos de muchas formas, ya sea por la fabricación de enzimas capaces de destruir el antibiótico, desarrollando vías metabólicas alternas o experimentando ciertos cambios que les permita vivir en presencia de fármacos.

Otros microorganismos continuamente se encuentran expuestos a iones inorgánicos, algunos de estos iones son captados como nutrientes esenciales, mientras que otros que no

tienen función biológica, provocan efectos tóxicos sobre las células. Varios mecanismos bacterianos de resistencia a metales tóxicos han sido estudiados a nivel molecular (Silver y Walderhaug, 1992). Se cree que las cianobacterias toleran el arseniato por que poseen mecanismos de resistencia que incluyen tanto sistemas membranales de expulsión como vías metabólicas intracelulares.

## C. Antecedentes Directos y Justificación.

Los trofozoitos de *E. histolytica* son anaerobios facultativos, capaces de consumir oxígeno a pesar de carecer de mitocondrias (McLaughlin y Aley, 1985), así como también de catalasas, peroxidasas u otras enzimas que contengan grupos hemo (Bakker-Grunwald y Wöstmann, 1993). Metabólicamente el Fe en la amiba se encuentra en la forma de enzimas tipo diaforasa (Weinbach et al., 1977), proteínas ferrosulfuradas (Fe-S) (Weinbach et al., 1980) y ferredoxinas (Reeves et al., 1980). Estas proteínas que contienen Fe proveen una vía oxidativa para el metabolismo aeróbico del parásito en ausencia de un sistema de citocromos. Otra proteína de la amiba que contiene Fe es la superóxido dismutasa (Tannich y Bruchhaus, 1994), la cual le sirve como un mecanismo de defensa que la protege contra la toxicidad y el daño causado por radicales superóxido como el  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  producidos por los fagocitos (Martínez-Palomo, 1987).

En el caso de *E. histolytica*, se cree que obtiene el Fe principalmente de la fagocitosis de bacterias, células de descamación del epitelio intestinal, eritrocitos o hepatocitos (Diamond et al., 1978b). Latour y Reeves (1965), encontraron que esta amiba necesita al menos una concentración de  $12 \mu M$  y que cantidades menores conducen a la pérdida del cultivo en dos o tres resiembras sucesivas y que el estado ferroso del Fe es el utilizado por la amiba.

Por otra parte Smith y Meerovitch (1982) encontraron que la concentración que requieren las amibas para su crecimiento es menor de  $2 \mu M$ ; y que pueden utilizar cualquiera de los dos estados del Fe, además demostraron que entre más virulenta sea una cepa, ésta requiere una mayor concentración de Fe para su crecimiento. Diamond et al., (1978b), reportaron que *E. histolytica* no crece en ausencia de Fe adicional en su medio de cultivo

(sin embargo no muestra datos experimentales); y además menciona que la amiba es capaz de utilizar ferritina, lisados de eritrocitos de conejo y citrato férrico como fuentes de Fe.

En cuanto a la tolerancia al Fe por parte de *E. histolytica*, **Smith y Meerovitch (1982)**, observaron la inhibición del crecimiento amibiano a las 48 horas en los medios de cultivo, cuando las concentraciones de Fe están por arriba de las óptimas (100  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo **Latour y Reeves (1965)** encontraron que la multiplicación de las amibas es una función directamente proporcional a la concentración de Fe total para las primeras resiembras.

En nuestro laboratorio, utilizando concentraciones de Fe más altas a las reportadas anteriormente por **Smith y Meerovitch (1982)**, se ha logrado mantener por más de 72 horas la cepa de *E. histolytica* HM-1: IMSS. Además, **Serrano (1997)** observó que las amibas crecidas en condiciones de deficiencia de Fe presentan un crecimiento menor, así como una disminución de su tamaño, adicionalmente se ha observado que estas tienden a redondearse y a adherirse a las superficies de vidrio o de plástico con menor eficiencia.

En cuanto a las observaciones de exceso del metal, sabemos que el Fe además de ser un elemento importante en el metabolismo de la amiba, también puede ser un catalizador importante en la generación de especies de oxígeno reactivas en contra de las células, lo cual conduce a un estrés oxidativo (**McCord, 1996**).

La amiba al utilizar el metabolismo aerobio (**Weinbach, 1981**) genera radicales libres, los cuales podrían dañarla si no contara con mecanismos celulares que la protegieran, como puede ser la enzima superóxido dismutasa (**Tannich y Bruchhaus, 1994**). Sin embargo, al estar la amiba en un medio con exceso de Fe, se encontraría a merced del estrés oxidativo generado en este caso por el metal, lo cual resultaría en la activación de un número de reacciones adversas que podrían conducirla hacia la apoptosis (**Buttke y Sandstrom, 1994**).

En diferentes organismos, desde *Escherichia coli* hasta el hombre, en respuesta a diferentes tipos de estrés se expresan algunas proteínas que rescatan a las células del daño (**Lindquist y Craig, 1988**). Para iniciar este estudio se exploraron las posibles alteraciones que existen en la expresión de proteínas de estrés y como un candidato se seleccionó a la proteína de choque térmico (heat shock) de 70 kDa (Hsp-70), pues existen evidencias de

que la expresión de proteínas de choque térmico y el estrés oxidativo (el cual puede ser generado por Fe) pueden ser fenómenos relacionados (Lee et al., 1983). Aparentemente las proteínas de choque térmico, son inducidas por estrés moderado, el cual en si mismo no es necesariamente letal, pero éstas pueden proteger al organismo de estrés más severos (Lindquist y Craig, 1988), y además la Hsp-70 es una proteína que se encuentra altamente conservada, y por supuesto también la contiene la amiba *Entamoeba histolytica* (Ortner et al., 1992).

En cuanto a la deficiencia de Fe, nosotros creemos que podría estar involucrada en la expresión de proteínas de ayuno de Fe, como sucede en bacterias del género *Neisseria spp* (Yamamoto et al., 1995), las cuales expresan proteínas de membrana externa capaces de capturar el Fe de proteínas del huésped, tales como transferrina, o como el caso de *Bacteroides spp* (Otto et al., 1988) que expresa varias proteínas bajo estrés por Fe, o bien podría inhibirse la síntesis de proteínas menos importantes. Por otra parte, los cambios en la morfología y adhesión de las amibas, observados en aquellas células crecidas en condiciones limitantes del metal, pueden estar asociadas con cambios en el citoesqueleto, por lo tanto otro de los intereses de este trabajo fue investigar si existen alteraciones en la expresión de proteínas que tienen que ver con la morfología y la adhesión de la amiba al vidrio o al plástico, y para hacer este estudio se exploraron los cambios en el sistema de microfilamentos del citoesqueleto, particularmente en la actina.

La actina es la proteína principal del sistema de microfilamentos del citoesqueleto, interviene en una gran variedad de funciones biológicas esenciales en todas las células eucariotas, provee de un armazón estructural a la célula, a la que da forma y polaridad definida y sus propiedades dinámicas proveen la fuerza de conducción para que la célula pueda moverse y dividirse (Hall, 1998). Esta matriz podría incluso participar en el metabolismo celular al aportar un marco tridimensional para los acontecimientos moleculares que constituyen los procesos celulares vitales (Drubin y Hirokawa, 1998).

De esta forma, uno de los intereses fundamentales del presente trabajo es el conocer las posibles alteraciones producidas en *Entamoeba histolytica* por el estrés por Fe, tanto en

condiciones limitantes del metal, como en altas concentraciones; así como iniciar el conocimiento de los posibles mecanismos de defensa que despliegue la amiba ante este estrés. Finalmente, creemos que conviene entender los problemas que se le presentan a la célula amibiana y las estrategias que utiliza para enfrentarlas, ya que para sobrevivir tiene que ser capaz de adaptarse a condiciones ambientales adversas, en este caso bajo el estrés por Fe. Los patrones de respuesta a este estrés, podrían conducirnos a una comprensión mayor de la biología de este organismo patógeno.

### III. Objetivos.

#### OBJETIVO GENERAL:

\* El Fe además de ser un elemento importante en el metabolismo de la amiba, también puede ser un catalizador importante en la generación de especies de oxígeno reactivas en contra de las células, lo cual conduce a un estrés oxidativo. Por lo cual se evaluarán los efectos estresantes por falta y exceso de hierro en trofozoitos de *Entamoeba histolytica* cepa HM-1:IMSS.

#### OBJETIVOS PARTICULARES:

\* Cuantificar la cantidad de hierro total intracelular, en amibas crecidas en medio de Diamond con diferentes concentraciones de hierro, por debajo y por arriba de las óptimas de crecimiento.

\* Determinar si existen diferencias en la expresión de proteínas totales por parte de los trofozoitos crecidos en medios de cultivo con diferentes concentraciones de hierro.

\* Observar el posible daño producido al citoesqueleto de *E. histolytica*, debido a las condiciones estresantes del hierro, usando anticuerpos anti-actina, así como también por espectrofluorometría, con base en la concentración de actina-F.

\* Identificar la presencia y expresión de la proteína de choque térmico Hsp70 debido al efecto oxidativo provocado por el hierro, mediante anticuerpos anti-Hsp70.

## IV. Materiales y Métodos.

### Cepa y condiciones de cultivo.

La cepa empleada en los experimentos fue la de *E. histolytica* HM-1:IMSS, aislada originalmente en México de un caso de disentería amibiana (De la Torre y cols, 1971). Los trofozoitos de *E. histolytica* se mantuvieron en condiciones axénicas usando medio de Diamond TYI-S-33 (Diamond, 1978 a); medio de Diamond sin la adición de citrato férrico (sólo con trazas de hierro), medio desferrado (medio de Diamond sin citrato férrico y tratado con 5 g/l de una resina quelante de hierro, Chelex-100® Bio-Rad), y medios TYI-S-33 suplementados con diferentes concentraciones de citrato férrico amoniacal, representados como: TYI<sub>2x</sub>-S-33, TYI<sub>5x</sub>-S-33, TYI<sub>10x</sub>-S-33 y TYI<sub>15x</sub>-S-33, en donde X=2.24 mg de citrato férrico/400 ml de medio Diamond total. Los cultivos se incubaron a 37 °C en tubos de borosilicato de 13 X 120 mm con tapón de rosca con 12 ml de medio o en cajas de cultivo con 125 ml de medio y fueron cosechados para los experimentos después de 72 hrs.

### Preparación del material.

Con el fin de eliminar el hierro contaminante, el material de cristalería fue tratado con HCl 6N durante 24 hrs y después se lavó varias veces con agua bidestilada y se esterilizó en olla de presión (120 Kg/cm<sup>2</sup> durante 15 min), para su posterior uso. El material plástico (puntas de micropipetas y tubos eppendorf), se trató toda la noche con HCl 6 N, y posteriormente se lavó varias veces con agua desionizada para eliminar el ácido, después se lavó toda la noche con metanol absoluto y se secó al aire. El material seco se colocó en cajas cubiertas para su posterior uso.

### Medición de hierro en extractos amibianos.

Se cultivaron trofozoitos de la cepa de *E. histolytica* en medio Diamond TYI-S-33 durante 48 hr, posteriormente fueron cosechados y lavados con medio Diamond desferrado, después se tomó una muestra y se contaron los trofozoitos en una cámara de Neubauer bajo

el microscopio invertido (Zeiss) con el fin de sembrar  $1 \times 10^6$  trofozoitos de *E. histolytica* en cajas de cultivo con 125 ml de cualquiera de los medios de cultivo anteriormente mencionados.

Después de 72 hr de cultivo se cosecharon las amibas, enfriándolas en hielo por 15 min y centrifugando a 1500 rpm por 5 min, para después lavar en dos ocasiones con amortiguador salino con fosfatos (PBS 1x, pH 7.4 ). Posteriormente se tomó una muestra para contarlas en una cámara de Neubauer. Finalmente se resuspendieron 1 millón de trofozoitos por cada 0.5 ml de PBS y se colocaron en tubos de borosilicato de 10 X 100 mm con tapón de rosca.

Una vez que se tuvieron todas las muestras problema se continuó con el método de Wayne (1988), el cual consiste en los siguientes pasos: digestión ácida, reducción y determinación espectrofotométrica del Fe utilizando un método colorimétrico, los cuales se describen más detalladamente a continuación.

## **PROCEDIMIENTO.**

### **Reactivo A: Agente liberador de hierro.**

Se prepararon las siguientes soluciones: 1.2 M de ácido clorhídrico (HCl) y 4.5% (w/v) (0.285 M) de permanganato de potasio ( $KMnO_4$ ) y se mezclaron a volúmenes iguales dentro de una campana de extracción debido a que durante la reacción se liberan gases. Esta solución se almacenó en botellas color ámbar.

### **Reactivo B: Agente reductor.**

En 25 ml de agua desionizada se disolvieron 8.8 g de ácido ascórbico, el cual reduce el exceso de permanganato además de liberar el metal, y 9.7 g de acetato de amonio, el cual da un pH final de 4.5-5, este pH cae dentro del rango de pH 4-9 en el cual el hierro puede ser medido por el método de la ferrocina (Stookel, 1970). Para obtener mejores resultados el hierro contaminante de esta solución se removió dejándolo una noche con 0.13 g de Chelex-100<sup>®</sup> (Bio-Rad) en agitación constante a 4 °C, para después filtrar la resina, aforar a 25 ml y almacenarse en botellas ámbar. Esta solución sólo dura 3-6 meses a temperatura ambiente.

Se adicionó 0.5 ml del reactivo A en 0.5 ml de la solución problema, se mezcló e incubó por 2 hr a 60 °C, seguido de la digestión se adicionó 0.1 ml del reactivo B y posteriormente se incubó por 30 min a 37 °C. Después se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min y se siguió el método para la medición del hierro con el "kit" de Sigma utilizando el sobrenadante. Método basado en la reacción del hierro ferroso disociado que reacciona con la ferrocina formando un complejo magenta, en donde el color formado es proporcional a la concentración de hierro en la muestra (Stookel, 1970).

① Se tomaron 2.5 ml del amortiguador de tris (0.5 mol/l, pH 8.1) y se agregaron a un tubo de ensaye. ② Se adicionó 0.5 ml de la solución problema (muestra digerida). ③ Se adicionaron 50  $\mu$ l de reactivo colorante. ④ Se incubó durante 1 hr a 37 °C. ⑤ Posteriormente se tomaron lecturas de absorbancia a 560 nm de longitud de onda, con ayuda de un espectrofotómetro BECKMAN DU <sup>®</sup> 7500 (se utilizó un portaceldas de cuarzo, el cual fue lavado en cada ocasión con una solución al 2% de HCl y además con agua desionizada). ⑥ Finalmente las lecturas obtenidas se expresaron en concentraciones  $\mu$ M de hierro, con ayuda de un "stock" de hierro del mismo "kit" de Sigma.

### **Obtención de extractos amibianos.**

Se sembraron trofozoitos en medios de cultivo con diferentes concentraciones de hierro, se cosecharon después de 72 hr por centrifugación y se lavaron muy bien con PBS 1X. Después de los lavados el sobrenadante se desechó, posteriormente a la pastilla se le adicionó un volumen equivalente (1:1) de un cocktail de inhibidores de proteasas (PMSF 100 mM; EDTA 100 mM; NEM 100 mM; IA 10 mM y p-HMB 100 mM, todos los inhibidores fueron de Sigma). Las células se rompieron por 3 ciclos de congelación-descongelación colocando los tubos en un vaso con hielo seco más etanol y luego en agua a 37 °C. Se tomaron muestras de 5  $\mu$ l, para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976). Posteriormente se adicionó un volumen igual (1:1) de buffer muestra 2x y se calentaron los extractos por 5 minutos en agua hirviendo, después se agregó mercaptoetanol al 5% y se calentó nuevamente por 3 minutos.

### **Electroforesis de extractos amibianos.**

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, de acuerdo a Laemmli (1970), Los geles se precorrieron a 45 V por 20 minutos en amortiguador de corrida, transcurrido el tiempo, en cada pozo se colocó el volumen de muestra necesaria (20-40 µg de proteína) y se corrieron a 100 V durante 1.5 hr en el mismo amortiguador de corrida, empleando una unidad vertical de electroforesis (Mighty Small II, SE 250). Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se tiñeron con una solución de azul de Coomassie en agitación leve durante 30 min, posteriormente se destiñen con agua/metanol/ácido acético (5:4:1 vol), se secaron y se les tomo fotografías.

### **Electrotransferencia.**

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% y una vez que se corrieron las proteínas en el gel, se procedió a hacer una transferencia en papel de nitrocelulosa en una cámara de transferencia (Bio-Rad, mini trans-blot cell 153BR) durante 1 hora a 253 mA, con amortiguador de transferencia (agua, metanol, PBS 10x. al 8:1:1 vol), después se hicieron varios lavados al papel con PBS-Tween y se incubó por dos horas con leche descremada para bloquear en sitios inespecíficos, nuevamente se hicieron varios lavados con PBS-Tween, para después incubar con un anticuerpo anti-actina o bien con anticuerpos anti-Hsp70.

### **Prueba contra anticuerpos anti-actina y anti-Hsp70.**

El papel de nitrocelulosa fue incubado durante dos horas con el anticuerpo anti-actina de cerebro de rata, posteriormente se lavó varias veces con PBS-Tween para luego incubar por 2 horas con inmunoglobulina G (IgG) anti-ratón (1:10000), nuevamente se hicieron lavados con PBS-Tween y se agregó 1 ml de peróxido de hidrógeno más 1 ml de luminol y se incubó por 10 minutos, después se dejó secar sobre papel filtro al aire. En el caso de Hsp70, se utilizó otra transferencia en papel de nitrocelulosa, el cual fue incubado durante dos horas con el anticuerpo anti-Hsp70 (1:500), para posteriormente seguir los mismos pasos hechos en la prueba anterior. Finalmente las bandas que contenían el complejo de proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia al exponerse en placas para rayos X.

## **Determinación de actina-F usando faloidina rodamina, a través de espectrofluorometría.**

Los trofozoítos crecidos durante 72 horas en los diferentes medios de cultivo, fueron colectados por separado, lavados en PBS 1X, contados y depositados ( $1 \times 10^6$ ) en tubos eppendorf estériles, para ser fijados con 300  $\mu$ l de una solución de formaldehído al 3.7% en PBS pH 7.4 a temperatura ambiente durante 20 minutos, posteriormente se agregaron 80  $\mu$ l de acetona y se incubaron por 6 minutos, después las preparaciones se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente con faloidina rodamina (se resuspendieron 5  $\mu$ l de faloidina, Sigma, conc. 1 mg/ml en 50  $\mu$ l de PBS, por prueba). Al final de la incubación con faloidina, las células se lavaron cinco veces en PBS pH 7. Finalmente, estas muestras fueron cuantificadas con ayuda de un espectrofluorómetro (se utilizó una longitud de onda de excitación de 550 nm y una longitud de emisión de 574 nm), y los valores obtenidos fueron graficados.

### **Viabilidad.**

Antes de los ensayos se determinó la viabilidad de las amibas en cada una de las pruebas, utilizando la técnica de azul de tripano (las amibas viables no se tiñen de azul y pueden ser contadas). Además se realizó una cinética de crecimiento en las diferentes concentraciones de hierro, utilizando un inóculo inicial de 10,000 trofozoítos para cada prueba (por triplicado), los cuales habían sido crecidos previamente en condiciones normales. Las cosechas se hicieron cada 72 hr y se sembró sucesivamente en cada concentración la cantidad inicial.

## IV. Resultados

Se hicieron mediciones en medios de cultivo Diamond TYI-S-33 suplementados con diferentes cantidades de citrato férrico (Tabla 1), las cuales aportaron concentraciones diferentes de hierro (100-890  $\mu\text{M}$ ). A la vez también se midió la cantidad de hierro en un medio quelado con resina, el cual fue suplementado con suero de ternera más vitaminas, presentando una concentración de 19  $\mu\text{M}$  de Fe, mientras que a un medio al cual no se le adicionó citrato férrico ni fue quelado, pero que contenía Fe contaminante de los reactivos, presentó una concentración de 40  $\mu\text{M}$ .

### Mediciones de hierro en medios de cultivo.

Tabla 1. Concentraciones de hierro en los medios de cultivo empleados en el crecimiento de *E. histolytica* \*

| MEDIO DE CULTIVO         | HIERRO ( $\mu\text{M}$ ) |
|--------------------------|--------------------------|
| Desferrado               | 19 $\pm$ 4.36            |
| Trazas                   | 40 $\pm$ 4.77            |
| TYI-S-33                 | 100 $\pm$ 6.89           |
| TYI <sub>150</sub> -S-33 | 150 $\pm$ 2.84           |
| TYI <sub>330</sub> -S-33 | 330 $\pm$ 11.19          |
| TYI <sub>630</sub> -S-33 | 630 $\pm$ 17.46          |
| TYI <sub>890</sub> -S-33 | 890 $\pm$ 24.44          |

| APORTE DEL       | HIERRO ( $\mu\text{M}$ ) |
|------------------|--------------------------|
| Suero de ternera | 5 $\pm$ 2.61             |
| Citrato férrico  | 69 $\pm$ 8.15            |

\* Medición hecha mediante la técnica de la ferrocina, y cantidades de hierro aportadas por el suero de ternera y el citrato férrico al medio.

Estos medios fueron utilizados para el crecimiento axénico de *E. histolytica*, primeramente se usaron para realizar una tasa instantánea de crecimiento a partir de trofozoitos crecidos en condiciones normales, resemebrando por triplicado  $1 \times 10^4$  trofozoitos en cada prueba, y crecidos durante 72 horas a 37 °C (Tabla 2). después de varias resiembras de 72 horas se aprecia (Fig. 1) un considerable crecimiento amibiano al aumentar las concentraciones de Fe en los medios de cultivo. Con respecto a la primera resiembra tenemos una relación de crecimiento de 3:1 para la concentración de 150  $\mu\text{M}$  con respecto al control, en el caso de las concentraciones de 330 y 630  $\mu\text{M}$  es de 2:1 y de 1.5:1 respectivamente, mientras que para 890  $\mu\text{M}$  el crecimiento se mantuvo muy cercano al control.

A medida que se avanza en el número de resiembras, se aprecia que va disminuyendo el crecimiento de las amibas con respecto a su anterior cosecha, excepto para las concentraciones de 100 y 150  $\mu\text{M}$ , las cuales presentan un crecimiento similar a partir de la tercera resiembra (500-600 mil trofozoítos).

En el caso de las concentraciones por debajo de las "óptimas" se aprecia claramente una disminución considerable del crecimiento total. A concentraciones de 19  $\mu\text{M}$  vemos que es muy difícil el mantenimiento de las amibas ya que sólo soportan una sola resiembra en estas condiciones. Al aumentar la concentración a 40  $\mu\text{M}$ , observamos que pueden mantenerse por cinco resiembras (posiblemente más). Sin embargo, su crecimiento paulativamente disminuye a medida que avanzamos en el número de resiembras.

### Tasa instantánea de crecimiento amibiano en diferentes concentraciones de hierro.

Tabla 2. Tasa instantánea de crecimiento (valores promedio de tres experimentos independientes).\*

| MEDIO DE CULTIVO         | Conc. de Hierro ( $\mu\text{M}$ ) | # amibas              |                       |                       |                       |                       |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                          |                                   | 1 Resiembra           | 2 Resiembra           | 3 Resiembra           | 4 Resiembra           | 5 Resiembra           |
| Desferrado               | 19                                | 23,333<br>$\pm$ 2880  | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     |
| Trazas                   | 40                                | 146,667<br>$\pm$ 4646 | 133,333<br>$\pm$ 1527 | 123,333<br>$\pm$ 4041 | 36,667<br>$\pm$ 2254  | 75,000<br>$\pm$ 3968  |
| TYI-S-33                 | 100                               | 288,333<br>$\pm$ 3883 | 363,333<br>$\pm$ 4368 | 545,000<br>$\pm$ 5766 | 593,333<br>$\pm$ 6027 | 565,000<br>$\pm$ 4856 |
| TYI <sub>2x</sub> -S-33  | 150                               | 966,667<br>$\pm$ 4540 | 706,667<br>$\pm$ 6434 | 538,000<br>$\pm$ 2362 | 590,000<br>$\pm$ 1000 | 591,667<br>$\pm$ 7783 |
| TYI <sub>5x</sub> -S-33  | 330                               | 610,333<br>$\pm$ 6503 | 500,000<br>$\pm$ 2254 | 398,333<br>$\pm$ 5536 | 275,667<br>$\pm$ 5204 | 282,000<br>$\pm$ 1527 |
| TYI <sub>10x</sub> -S-33 | 630                               | 478,333<br>$\pm$ 5757 | 448,333<br>$\pm$ 6383 | 233,333<br>$\pm$ 5220 | 196,667<br>$\pm$ 8129 | 216,667<br>$\pm$ 4929 |
| TYI <sub>15x</sub> -S-33 | 890                               | 240,833<br>$\pm$ 3642 | 180,000<br>$\pm$ 6639 | 180,000<br>$\pm$ 4041 | 171,667<br>$\pm$ 3685 | 170,667<br>$\pm$ 3329 |

\* Para la colecta de la primera resiembra se utilizaron 10 mil trofozoítos de amiba, los cuales fueron crecidos en condiciones normales, además cada resiembra se realizó cada 72 horas con la misma cantidad de amibas y por triplicado en cada prueba.

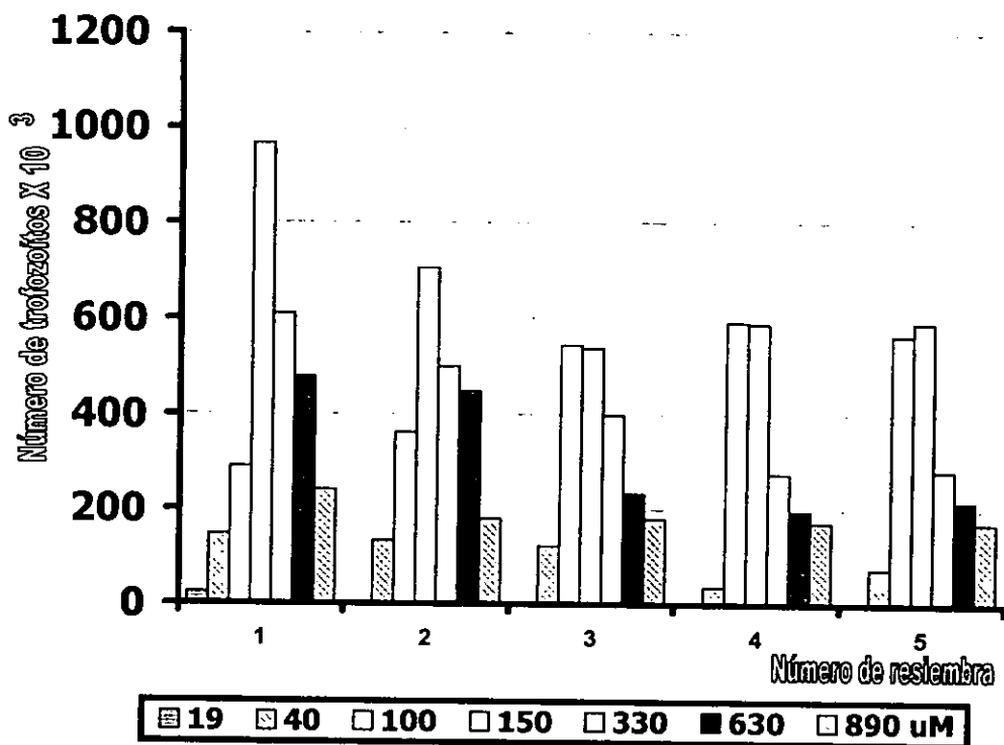


Figura 1. Tasa instantanea de crecimiento amibiano, basada en los datos de la tabla 3. Concentraciones de hierro utilizadas en los medios de cultivo para el crecimiento (72 hr) de las amibas. Nota: primero se resiembran amibas en un medio normal (100 µM) por 48 hrs y después se transfieren a los diferentes medios por 72 hr.

Con el fin de interpretar el efecto del Fe en el crecimiento de las amibas, se midió la cantidad total de Fe por el método de la ferrocina en extractos de tofozoitos ( $1 \times 10^6$ ) colectados de la primer resiembra (después de haber crecido por 72 hr), de cada uno de los medios suplementados con diferentes concentraciones del metal, a la vez también se aprovecho para medir la cantidad de proteínas totales en los extractos.

En las mediciones de Fe y proteínas totales (Tabla 3), podemos ver que cantidades menores de Fe en el medio provocan en las amibas una disminución en la cantidad de Fe interno (Fig. 2) y proteínas totales (Fig. 3).

## Mediciones de hierro y proteínas totales en extractos amibianos.

Tabla 3. Concentraciones de Fe en extractos amibianos de *E. histolytica* ( $1 \times 10^6$  células).\*

| MEDIO DE CULTIVO<br>Conc. de hierro ( $\mu\text{M}$ ) | $\mu\text{M}$ Hierro<br>(Extractos) | $\mu\text{g}$ Proteínas<br>(Extractos) |
|---|-------------------------------------|--|
| 19  | $11.51 \pm 1.76$                    | $230.5 \pm 0.45$                       |
| 40  | $15.17 \pm 1.76$                    | $353 \pm 0.79$                         |
| 100   | $25.20 \pm 2.18$                    | $467 \pm 0.39$                         |
| 150   | $41.88 \pm 1.54$                    | $642.5 \pm 0.48$                       |
| 330   | $54.14 \pm 5.71$                    | $729 \pm 1.18$                         |
| 630   | $69.15 \pm 3.72$                    | $856.5 \pm 1.35$                       |
| 890   | $69.45 \pm 8.81$                    | $438.5 \pm 2.33$                       |

\* Después de 72 hr de crecimiento en los distintos medios de cultivo suplementados con diferentes cantidades de Fe, y concentraciones de proteínas totales en extractos de amibas ( $1 \times 10^6$  células). Nota: en todos los casos se realizaron pruebas de viabilidad encontrándose valores por arriba del 95%.

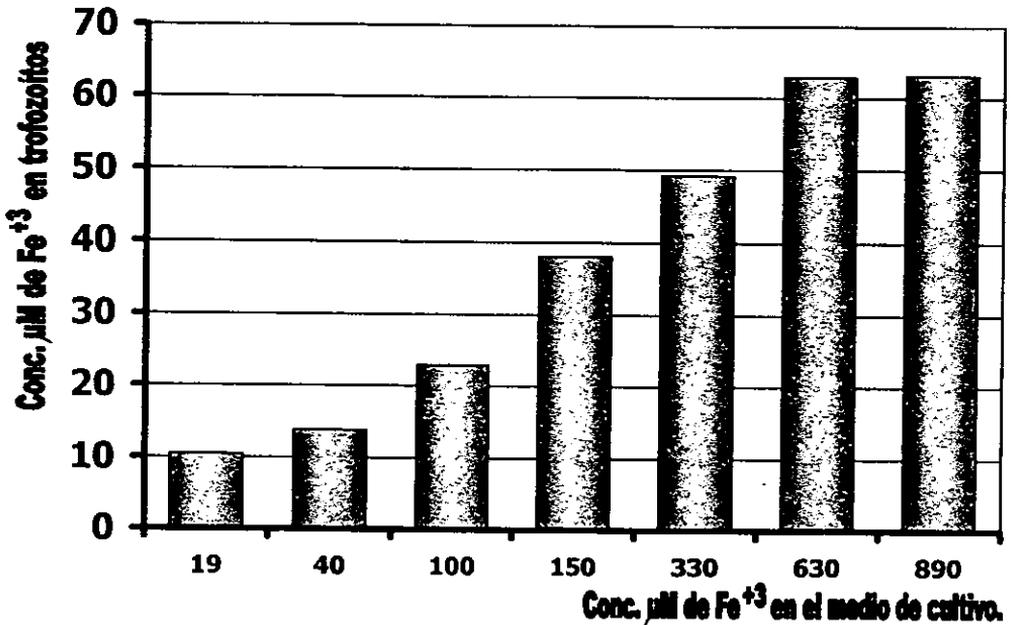


Figura 2. Concentración de Fe encontrada en extractos amibianos ( $1 \times 10^6$  células) después de 72 hr de incubación en cada concentración de Fe de los medios de cultivo.

Esto se relaciona muy bien con el bajo crecimiento observado en la Figura 1, debido a que una disminución de Fe en el medio provoca una menor incorporación del metal y con ello una baja síntesis de proteínas (Tabla 3) con respecto al control ( $100 \mu\text{M}$ ).

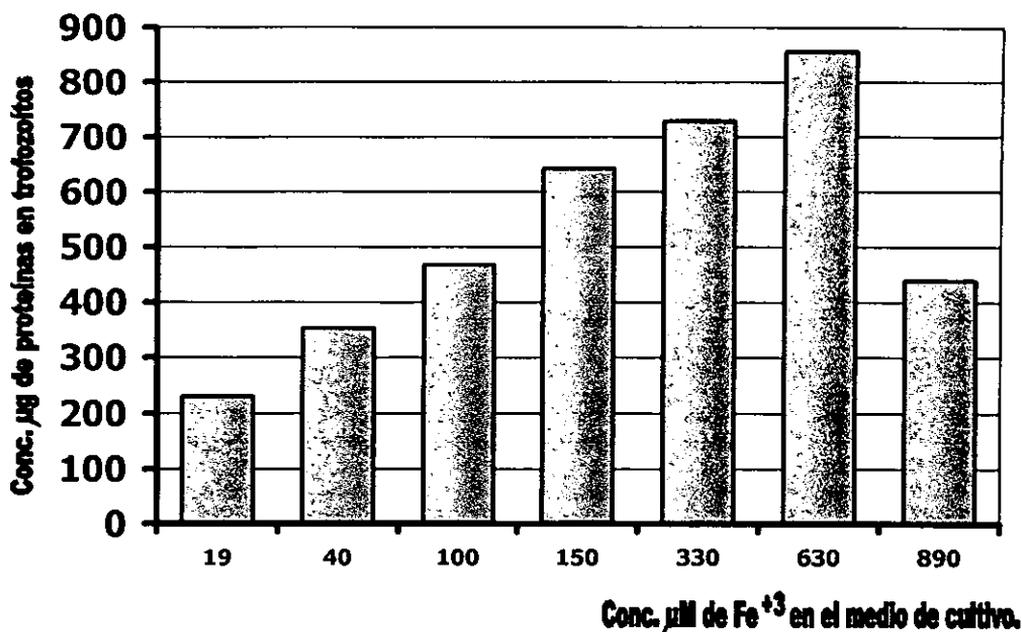
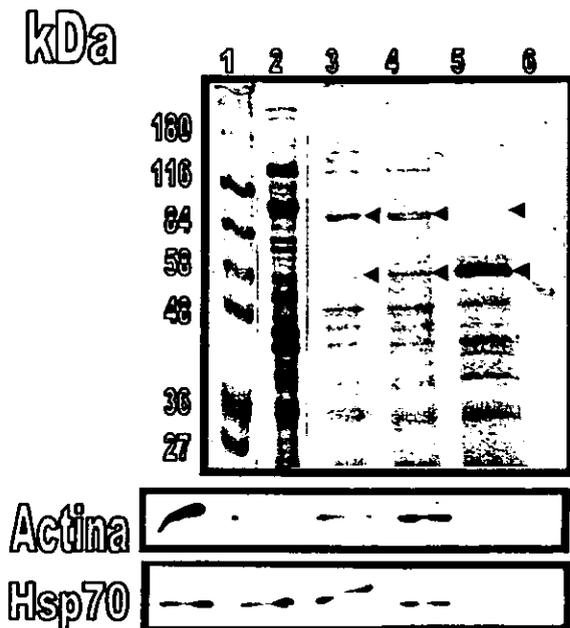


Figura 3. Concentración de proteínas encontrada en extractos amibianos ( $1 \times 10^6$  células) después de 72 hr de incubación en cada concentración de Fe de los medios de cultivo.

Al observar concentraciones más altas al control (100  $\mu\text{M}$ ), vemos el efecto contrario, ya que se aprecia un aumento progresivo de la cantidad de Fe (Fig. 2), así como de las proteínas totales en la amiba (Fig. 3), excepto para la concentración de 890  $\mu\text{M}$  de Fe en el medio de cultivo, en la cual crecieron las amibas, las cuales presentan aproximadamente la misma cantidad de Fe interno que las amibas crecidas en medios con concentraciones de 630  $\mu\text{M}$ .

Nuevamente estos datos van de la mano con la Fig. 1, ya que una menor cantidad de Fe en el medio de cultivo origina una mayor incorporación del metal, por parte de *E. histolytica* lo cual provoca una mayor síntesis de proteínas, así como un mayor crecimiento con respecto al control, excepto como ya se mencionó, en la última concentración (890  $\mu\text{M}$ ) donde presenta una menor tasa de crecimiento. Cabe resaltar que la cantidad de proteínas en amibas crecidas en esta última concentración, no aumenta sino que disminuye a tal grado de estar por debajo de los niveles del control 100  $\mu\text{M}$  (Fig. 3).



**Figura 4.** Electroforesis de extractos amibianos en geles de poliacrilamida al 12%. Carriles: ❶ Marcadores de peso molecular. Los carriles del 2-5 son extractos amibianos crecidos en medio de Diamond con concentraciones de hierro del orden de: ❷ 100  $\mu\text{M}$ . ❸ 19  $\mu\text{M}$ . ❹ 40  $\mu\text{M}$ . ❺ 84  $\mu\text{M}$  (Nota: esta concentración esta dada en un medio quelado, el cual posteriormente se le adicionó la misma cantidad de citrato férrico de un medio normal). ❻ Anticuerpo anti-actina de cerebro de rata. Los recuadros de abajo son transferencias de las muestras 2-6 tratadas con anticuerpos anti-actina de cerebro de rata y anti-Hsp70.

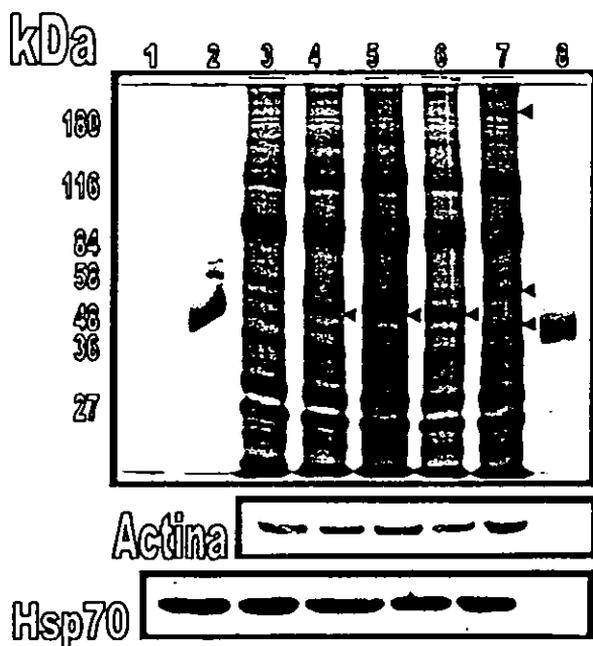


Figura 5. Electroforesis de extractos amibianos en geles de poliacrilamida al 12%. Carriles: ❶ Marcadores de peso molecular. ❷ Actina y de molleja de pollo. Los carriles del 3-7 son extractos amibianos crecidos en medio Diamond con concentraciones de hierro del orden ❸ 100  $\mu\text{M}$ . ❹ 150  $\mu\text{M}$ . ❺ 330  $\mu\text{M}$ . ❻ 630  $\mu\text{M}$ . ❼ 890  $\mu\text{M}$  y ❽ Anticuerpo anti-actina de cerebro de rata. Los recuadros de abajo son transferencias de las muestras 3-8 tratadas con anticuerpos anti-actina y anti-Hsp70.

Posteriormente al utilizar la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida, se encontró que los extractos (Fig. 4) totales de amibas crecidas por 72 horas en medios con concentraciones por debajo de las utilizadas normalmente (100  $\mu\text{M}$ ), presentan la aparición de un polipéptido de 88 kDa, el cual se mantiene bajo en los controles. Así como una disminución progresiva de un polipeptido de 56 kDa a medida que se reduce la cantidad de Fe en los medios de cultivo y el cual aparece al agregar Fe a medios de cultivo previamente quelados. Sin embargo no se logra un patrón en la expresión de proteínas igual al control.

Por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (Fig. 5), utilizando extractos amibianos que habían crecido previamente en concentraciones mayores al control (100  $\mu\text{M}$ ), se encontró la sobreexpresión de un polipéptido de 49 kDa en las concentraciones de 150, 330 y 630  $\mu\text{M}$ , mientras que en la concentración de 890  $\mu\text{M}$  se sobreexpresaron tres polipéptidos de 162, 56 y 40 kDa.

Se encontró por inmunoreconocimiento en papel de nitrocelulosa con anticuerpos monoclonales anti-actina de cerebro de rata y anti-Hsp70 una disminución aparente de la actina en amibas crecidas en condiciones de deficiencia de hierro (19 y 40  $\mu\text{M}$ ) con respecto al control (100  $\mu\text{M}$ ), mientras que la expresión de Hsp-70 prácticamente se mantiene constante (Fig. 4). En el caso de amibas que fueron crecidas en condiciones de exceso de hierro se encontró que tanto la actina así como la Hsp-70 se mantienen constantes en todas las concentraciones empleadas. Sin embargo el reconocimiento de la Hsp-70 es mucho más evidente (Fig. 5).

Finalmente se observó que concentraciones de Fe por arriba de las óptimas en la amiba, no interfieren en la expresión de actina-F (Fig.6), ni en la morfología. Sin embargo por debajo de esta concentración se encuentra la actina-F disminuida a la tercera parte, mientras que la morfología cambia al reducir su tamaño y redondearse. Estos datos indican que se expresan selectivamente las proteínas a diferentes concentraciones de Fe en el medio de cultivo.

Tabla 4. Concentración de actina-F, determinada en amibas crecidas en medios con diferentes concentraciones de Fe.\*

| CONC. DE HIERRO EN LOS MEDIOS DE CULTIVO ( $\mu\text{M}$ ). | 19    | 40    | 100   | 150    | 330   | 630   | 890    |
|---|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|
| Abs. de células tratadas con faloidina TRITC.               | 0.356 | 0.618 | 1.384 | 1.569  | 1.489 | 1.427 | 1.420  |
| Abs. de células tratadas con citocalasina.                  | 0.008 | 0.048 | 0.138 | -0.007 | 0.067 | 0.167 | -0.441 |

\* Las amibas fueron marcadas con faloidina TRITC, así como también tratadas con citocalasina D (antes de adicionar faloidina).

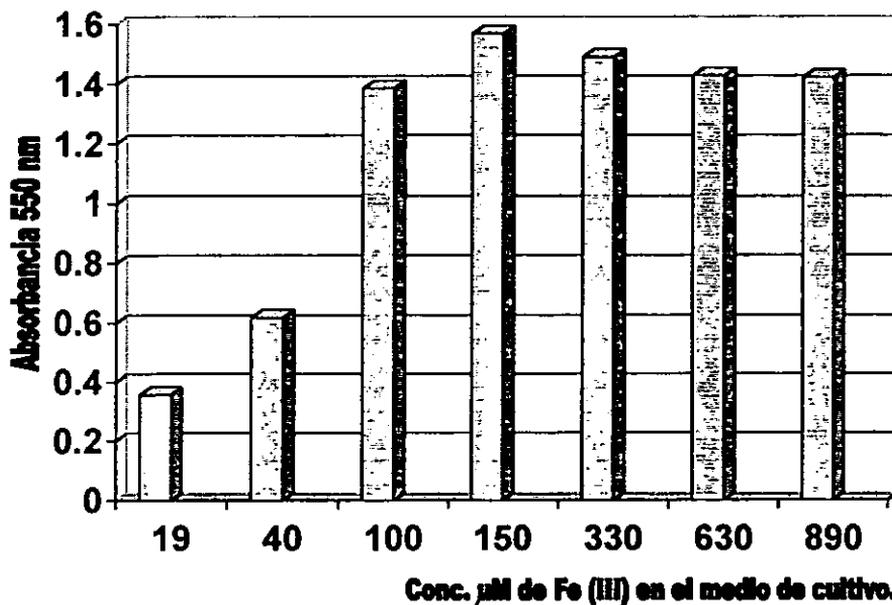


Fig. 6. Concentración de actina-F (absorbancia). Determinada en amibas ( $1 \times 10^6$  células) crecidas en medios con diferentes concentraciones de Fe. Las amibas fueron marcadas con faloidina TRITC. La lectura se realizó en el espectrofluorómetro, cada una de ellas con su respectivo control. Gráfica basada en los datos obtenidos en la tabla 4.

## Discusion.

El hierro (Fe) es uno de los metales esenciales para el crecimiento de animales, plantas y microorganismos ya que participa en una gran variedad de procesos criticos en la vida terrestre; su importancia en biología se refleja tanto por su versatilidad quimica como por su abundancia. Sin embargo, el Fe presenta una gran paradoja, ya que a pesar de ser muy abundante y necesario es insoluble y tóxico.

En el presente trabajo, se observaron los efectos en la síntesis de proteínas y el crecimiento de las amibas en condiciones de deficiencia y exceso de Fe.

Existen reportes de concentraciones mínimas de Fe para el mantenimiento de *Entamoeba histolytica*, del orden de 12  $\mu\text{M}$  (Latour y Reeves, 1965) a 4  $\mu\text{M}$  (Smith y Meerovitch, 1982). En contraste, en el presente trabajo se utilizaron concentraciones de 19 y 40  $\mu\text{M}$  (medio quelado y medio con trazas de Fe, suplementados con suero de ternera y vitaminas) donde observamos que la menor concentración (Tabla 2), no es capaz de soportar el crecimiento de las amibas por más de una resiembra, ya que al ser comparada con el control (100  $\mu\text{M}$ ) disminuye drasticamente su crecimiento (Fig. 1) y su tamaño, así como también se observó que se adhieren con dificultad a las paredes de las botellas de cultivo, mientras que amibas crecidas en concentraciones de 40  $\mu\text{M}$  de Fe, se lograron mantener al menos cinco resiembras sucesivas, sin embargo su crecimiento comparado con el control es muy pobre (Fig. 1).

Esta concentración de 40  $\mu\text{M}$  podría llamarse la concentración mínima de mantenimiento de cultivo, ya que la amiba no cambia su morfología con respecto al control, por lo menos en las primeras cinco resiembras.

Las diferencias de concentraciones reportadas anteriormente para el crecimiento de la amiba, podrían deberse sobre todo a que Latour y Reeves (1965) utilizando cultivos monóxenicos y no se sabe con certeza si las amibas toman el Fe que necesitan de las bacterias, mientras que Smith y Meerovitch (1982) utilizaron cultivos axénicos de cepas amibianas diferentes (NIH:200, IP-106 y DKB) a la que utilizamos (HM-1:IMSS), la cual podría tener diferentes requerimientos de Fe para su crecimiento.

Después de ver el crecimiento de *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS a concentraciones bajas de Fe, se procedió a cuantificar las cantidades de Fe y proteínas totales (Tabla 3) presentes en  $1 \times 10^6$  trofozoítos crecidos por 72 hr. Encontrándose que cuando las amibas crecen en medios de cultivo con concentraciones de  $19 \mu\text{M}$ , se tienen concentraciones de Fe dentro de la amiba de  $11.51 \pm 1.76 \mu\text{M}$  de Fe total y  $230 \pm 0.45 \mu\text{g}$  de proteínas totales. Si tomamos las concentraciones de Fe y proteínas totales de las amibas que crecieron en concentraciones óptimas ( $100 \mu\text{M}$ ) y le damos un valor de uno, entonces tenemos que los anteriores valores representan  $0.46\text{x}$  para el Fe y  $0.49\text{x}$  para las proteínas (disminuidas en un 50%).

Las amibas que crecieron en medios de cultivo con la concentración de  $40 \mu\text{M}$  presentaron  $15.17 \pm 1.76 \mu\text{M}$  de Fe y  $353 \pm 0.79 \mu\text{g}$  de proteínas, lo que nos da la siguiente relación  $0.60\text{x}$  para el Fe y  $0.76\text{x}$  para las proteínas.

Estos resultados, junto con la estimación del crecimiento amibiano a niveles bajos de Fe, nos dicen que *E. histolytica* al igual que muchos organismos depende del Fe para su crecimiento. Como podemos apreciar, al disminuir la cantidad interna de Fe total se reduce cantidad de proteínas totales (Tabla 3). Este elemento en la amiba estaría siendo requerido para la síntesis de proteínas como ferredoxinas (Reeves y cols, 1980), proteínas ferrosulfuradas (Weinbach y cols, 1980), enzimas tipo diaforasa (Weinbach y cols, 1977), y superóxido dismutasa (Tannich y Bruchhaus, 1994), las cuales tienen Fe en su molécula y son indispensables para el buen funcionamiento de su metabolismo.

La deficiencia de Fe provoca una disminución en el crecimiento en los microorganismos, por lo cual estos sacrifican enzimas que contengan este metal para seguir creciendo y sobreviviendo (Winder y O' Hara, 1962; Theodore y Shade, 1965). En el caso de la amiba, como anteriormente se mencionó, no sólo tiene un crecimiento disminuido a concentraciones por debajo de las óptimas de Fe (Fig. 1), sino que además nosotros observamos la disminución progresiva de un polipéptido de  $56 \text{ kDa}$  después de 72 hr de crecimiento en medios de cultivo a concentraciones de  $100$ ,  $40$  y  $19 \mu\text{M}$  de Fe (Fig. 4). En cambio Serrano (1997) menciona la inducción de una proteína de  $62 \text{ kDa}$  después

de 24-48 horas de ayuno de Fe. Respecto a la síntesis de proteínas este autor menciona una disminución en la captación de metionina marcada con azufre 35 en amibas crecidas durante 90 hrs en ausencia de Fe, así como la disminución de la síntesis de varias proteínas.

También se observó la aparición de un polipéptido de 88 kDa en las concentraciones de 40 y 19  $\mu\text{M}$ , el cual posiblemente se trata de un receptor de Fe, ya que disminuye en los controles que contienen Fe como son el medio normal y un medio previamente quelado al cual posteriormente se adicionó Fe (Fig. 4).

En resumen, de acuerdo con los trabajos de Serrano (1997) y el nuestro, bajo condiciones de deficiencias de Fe, la amiba expresa una proteína de 62 kDa después de 24-48 hrs de cultivo, sin embargo no se sabe si es una proteína de estrés o bien es un receptor acarreador de para alguna proteína que contenga Fe. A las 72 hrs disminuye un polipéptido de 56 kDa (Fig. 4), este polipéptido presenta una disminución de su expresión debido posiblemente a que se trate de proteínas con Fe, que son sacrificadas para aportar esta Fe a funciones más importantes que le ayuden a sobrevivir. La aparición de un posible receptor, la disminución de su crecimiento (Fig. 1), la reducción de su tamaño y redondeo, la facilidad para ser despegadas del lugar en que estén adheridas así como también la disminución de la síntesis de varias proteínas después de 72-90 hrs de crecimiento en deficiencia de Fe (Fig. 3). Todo esto nos habla de respuestas del microorganismo ante una situación de estrés por deficiencias de Fe.

Por estas razones nosotros intentamos conocer más a fondo si el ayuno de Fe afecta de algún modo la expresión de proteínas altamente conservadas como son la actina y la proteína de choque térmico Hsp70. Con ayuda de anticuerpos monoclonales anti-actina de cerebro de rata y anti-Hsp70, encontramos un reconocimiento disminuido en la actina ( Fig. 4) al reducir las concentraciones de Fe en los medios de cultivo. Sin embargo el reconocimiento de Hsp70 (Fig. 4) se mantiene constante con respecto al control. Esta proteína podría estar jugando un papel protector en estas condiciones.

Cuantificamos la cantidad de actina-F presente en amibas crecidas en bajas concentraciones de Fe, con ayuda de faloidina TRITC, una droga alcaloide del hongo *Amanita phalloides* que tiene preferencia por la forma filamentosa de la actina en

eucariontes (Wulf y cols, 1979 ). Esta faloidina se une a las unidades de actina de los microfilamentos y evita su despolimerización, así pues los microfilamentos por acción de la faloidina quedan trabados, con lo cual puede cuantificarse la actina espectrofluorométricamente a 550 nm. Los resultados obtenidos (Fig. 6) nos muestran una relación de actina- F con respecto al control de 1:3 para las amibas crecidas en medios con concentraciones de 19  $\mu\text{M}$  y de 1:2 para las de 40  $\mu\text{M}$ .

Cuando las células son tratadas con citocalasina D (un alcaloide proveniente de hongos que despolimeriza la actina), los niveles de fluorescencia detectados en el espectrofluorómetro son muy bajos (tabla. 4). Lo que comprueba que es la actina-F la que medimos inicialmente. Todo esto nos dice que la disminución de Fe en la amiba de alguna forma afecta la cantidad de actina-F y por tanto su adherencia al sustrato.

### ***Exceso de hierro.***

Mucho antes que los bioquímicos se dieran cuanto que el Fe es un elemento traza necesario y esencial para la vida, había una tendencia natural a asociarlo con la fuerza del organismo. Después de reconocer este elemento esencial, se supuso comúnmente (pero incorrectamente) que “más es mejor”. Sin embargo esto solo es verdad en personas deficientes en Fe.

La cantidad de Fe necesaria para un buen crecimiento en bacterias varía entre 0.02-0.2  $\mu\text{g/ml}$  medio (Weinberg, 1971), por ejemplo para el bacilo tuberculoso es de 0.09  $\mu\text{g/ml}$  (Kochan y col, 1971). Para mamíferos es de 1-3  $\mu\text{g/ml}$  (Kochan y col, 1969 ), mientras que para el cultivo de *Entamoeba histolytica* se ha venido utilizado el medio de cultivo de Diamond TYI-S.33 ( Diamond y cols, 1978a) que contiene 0.1  $\mu\text{g/ml}$  (100  $\mu\text{M}$ ). Esta concentración seguramente se encuentra en exceso y la amiba aprovecha un valor menor.

En cuanto a la tolerancia al Fe, en general no se conocen las concentraciones intracelulares de los iones metálicos capaces de contribuir al daño celular, por lo cual nos enfocamos a la tarea de buscarlas en la amiba. Primeramente conocíamos el trabajo de Smith y Meerovitch (1982), en el cual se menciona que el crecimiento amibiano se inhibe

a las 48 hr de cultivo cuando las concentraciones de Fe excedían a las óptimas (100  $\mu\text{M}$ ). Pero **Latour y Reeves (1965)** utilizando concentraciones de 4-400  $\mu\text{M}$ , observaron que la multiplicación de las amibas es una función directamente proporcional a la concentración de Fe total para las primeras resiembras.

En el presente trabajo la cepa HM-1: IMSS, presentó una tolerancia al Fe, aún mayor que la descrita por **Latour y Reeves (1965)**. También observamos que las amibas presentan una tasa de crecimiento mayor con respecto al control a medida que aumentamos las concentraciones de Fe de 100 a 630  $\mu\text{M}$  en los medios de cultivo durante las primeras tres resiembras (72 hr c/u). En concentraciones, tan altas como 890  $\mu\text{M}$  observamos un crecimiento disminuído, el cual se mantiene prácticamente igual desde la primera a la quinta resiembra (Fig. 1). Muy probablemente esta concentración sea tóxica para este protozoario.

En otros trabajos se ha observado que al adicionar Fe al suero humano, se aumenta el crecimiento de bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Pasteurella pestis* (**Jackson y Morrison, 1961**). Por otro lado **Schade (1963)** observa una correlación entre el crecimiento de *S. aureus* en suero humano y los niveles de saturación de Fe de la transferrina, mientras que **Bullen y Rogers (1969)** demuestran que la actividad antibacteriana del suero de conejo para *Pasteurella septica* y *Escherichia coli* puede ser neutralizada por la adición de Fe. Estos datos significan que algunas especies bacteriana, como las anteriormente mencionadas son capaces de tomar el Fe de transferrina para crecer, mecanismo muy utilizado por patógenos.

Con base en lo anterior aún no podemos mencionar con seguridad que el aporte de hierro para las amibas sea también por la transferrina del suero de ternera ya saturada al incluir más hierro de lo usual, ya que también podría darse un transporte activo o facilitado del Fe contenido en otros compuestos del medio que estuvieran quelando el metal. A este respecto **Serrano (1997)** encontró una proteína de 150 kDa en extractos crudos de *E. histolytica*, la cual es reconocida por transferrina humana que pudiera ser un receptor para esta proteína del huésped. La transferrina junto con la lactoferrina y la hemoglobina

seguramente son proteínas que la amiba puede utilizar como fuente de Fe para multiplicarse dentro del organismo.

Posteriormente, utilizando un método colorimétrico basado en la ferrocina (Stookel, 1970) logramos medir las concentraciones intracelulares de Fe en un extractos de  $1 \times 10^6$  amibas crecidas con exceso del metal, después de 72 hrs de cultivo. Además también se realizó la medición de proteínas totales en las mismas muestras (Tabla. 3). Si tomamos como control a las amibas crecidas en concentraciones de  $100 \mu\text{M}$  de Fe, vemos que al aumentar la concentración a  $150 \mu\text{M}$ , las amibas presentan un crecimiento, acelerado que se regulariza con el control de las ultimas tres resiembras (Fig. 1). Pero además al medir las concentraciones de Fe intracelulares de esta amibas, hubo un aumento con respecto al control de (  $25.20$  a  $41.88 \mu\text{M}$ , lo que significa el  $1.66\text{x}$ ). De igual forma en las proteínas totales tenemos un aumento con respecto al control de ( $467$  a  $645.5 \mu\text{g}$  lo que da una relación de  $1.38\text{x}$ ). Estos resultados nos dicen que tal vez  $100 \mu\text{M}$  no es la concentración óptima, pero que se ha usado como satisfactoria para el manejo de cultivo in vitro.

De igual forma para los demás amibas crecidas en las diferentes concentraciones tenemos para la concentración de  $330 \mu\text{M}$ , se observa el incremento de Fe ( $2.15\text{x}$ ) y proteínas ( $1.56\text{x}$ ) con respecto al control. Para la concentración de  $630 \mu\text{M}$  Fe en el medio de cultivo todavía se observa el incremento en el Fe ( $2.74\text{x}$ ) y proteínas ( $1.83\text{x}$ ) en las amibas. Finalmente en las amibas crecidas en concentraciones de  $890 \mu\text{M}$  se llega a una asíntota donde tal vez esta concentración ya es tóxica, ya que incremente el Fe interno un poco más ( $2.76\text{x}$ ) y disminuyen las proteínas totales ( $0.94\text{x}$ ).

Después de los anteriores resultados, el siguiente paso consistió buscar la expresión de proteínas de estrés de Fe, tanto a concentraciones por arriba y por debajo de la óptima ( $100 \mu\text{M}$ ). Esto se hizo por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%. Los extractos totales de amibas crecidas en concentraciones de  $150$ ,  $330$  y  $630 \mu\text{M}$ , presentaron la sobreexpresión de un polipéptido de  $49 \text{kDa}$  aproximadamente (Fig 5). Hay varias explicaciones para ello, por ejemplo, podría tener una función almacenadora del metal en forma de complejos, con lo cual no solo estaría anticipando un daño celular, sino que

además lo estaría empleando para la síntesis de nuevas proteínas, así como para su rápido crecimiento, o bien podría resguardarlo para afrontar condiciones de deficiencia del metal.

Como sabemos el almacenamiento de Fe en eucariotes se lleva a cabo con la ferritina (proteína soluble en agua de 18.5 kDa) y con la hemosiderina. En procariotes como *E. Coli*, *Proteus mirabilis*, *Mycoplasma capricolum* y *Azotobacter vinelandii* (Stiefel y Watt, 1979) se han visto proteínas ricas en Fe, las cuales tienen algunas similitudes con la ferritina de organismos superiores. En el caso de *A. vinelandii* se ha visto un citocromo tipo b, en el cual el Fe constituye 13-20% del peso de esta proteína (Stiefel y Watt, 1979). En *Clostridium pasteurianum* se han encontrado varias proteínas Fe-S, las cuales van desde 6-680 kDa y que destaca para nosotros una con un peso molecular de 50-60 kDa que tiene una función anabólica en la fijación de nitrógeno, esta nitrogenasa Fe-S tiene 4 Fe/4 S<sup>2-</sup> (Thauer and Schonheit 1982).

Por lo tanto, nosotros creemos que el polipéptido de 49 kDa podría tener dos funciones, una almacenadora de Fe con tres metas: ❶ prevenir posteriores deficiencias. ❷ evitar sus efectos tóxicos por exceso y ❸ aportar el metal a enzimas importantes para su crecimiento y multiplicación; como podría ser el caso de la ribonucleótido reductasa (aún sin reportar en amibas), una enzima que contiene Fe, el cual le sirve para oxidar tirosina (endógena) a radical tirosil, esencial para iniciar la conversión de ribonucleótidos a dinucleótidos, los precursores del DNA (Thelander y Richard, 1979) y su segunda función podría ser muy similar a las proteínas Fe-S de *C. pasteurianum*, es decir la proteína de 49 kDa de la amiba estaría fijando nitrógeno a proteínas de nueva síntesis producidas por la intervención de la ribonucleótido reductasa. Esto podría explicar el marcado crecimiento de las amibas, así como también el incremento de proteínas totales cuando se encuentran en condiciones de suficiencia de Fe con respecto al control, sobre todo en la primera resiembra (Fig. 1).

En otras células, los radicales superóxido por reducción liberan el Fe de la ferritina (Thomas y col, 1985; Bolann y Ulvik 1990) y se han propuesto que los O<sup>2-</sup> entran al centro de la ferritina a través de los canales hidrofóbicos, seguido por la reducción del Fe<sup>+3</sup> a Fe<sup>+2</sup>, lo cual capacita la liberación del Fe del centro de la ferritina (Biemond y col, 1988).

Por lo tanto llega un momento en que el Fe capturado sobresatura a las proteínas almacenadoras (como por ejemplo la de 49 kDa), y como la amiba al parecer no tiene un sistema selectivo de captura del metal, llegará un momento en el que el Fe que no es quelado dentro de la amiba inicie una lípido peroxidación, lo cual puede provocar la pérdida de la estructura y función de la membrana (McCord, 1996), o bien el  $O^{\cdot 2}$  al reaccionar con el Fe puede acelerar el daño al DNA (Keyer y Imlay, 1996; Henle y col, 1996).

Esto podría ayudarnos a entender que las amibas crecidas en concentraciones de 890  $\mu$ M al asimilar el metal y rebasar sus límites de saturación (Tabla 3) presentarían una aparente degradación del polipéptido almacenador de hierro de 49 kDa y por lo tanto presentan una cantidad de proteínas totales menores a las demás concentraciones (Tabla 3). Por otro lado aún continúa en debate si es estrés oxidativo (que puede ser provocado por el Fe) provoca un incremento en los niveles intracelulares de calcio, lo cual puede fragmentar el DNA por activación de endonucleasas dependientes de calcio (Farber 1980).

Otro radical tóxico que puede actuar en el daño celular, además del  $O^{\cdot 2}$  es el hidroxílico (OH) el cual es más oxidante (generado por la reacción de Haber-Weiss) y puede dañar a las células de otras maneras, ya que los radicales hidroxilo pueden hacer que las proteínas de membrana formen enlaces cruzados mediante la formación de puentes disulfuro (S-S). La aglomeración resultante de las proteínas de membrana formaría canales de iones o alteraría de otra manera la estructura de la función de la membrana (McCord, 1996). Los radicales hidroxilo también pueden interactuar con el ADN, una consecuencia funcional de este daño es la inhibición de la replicación del ADN (Halliwell y Aruoma, 1991).

Es aquí en donde la aparición de los polipéptidos de 162, 56 y 40 kDa en extractos amibianos crecidos en concentraciones de hierro del orden de 890  $\mu$ M, podrían ser muy importantes ya que estarían incrementando la resistencia a daños por estrés oxidativo generados por el exceso del metal. Sin embargo estos al parecer no controlan los niveles intracelulares (como Fur, IRP1 o Fnr) ya que las mediaciones de Fe intracelulares en la amiba permanecen altos, mientras que se da una disminución drástica en la síntesis de proteínas (Tabla 3), así como una reducción en el crecimiento con respecto al control (Fig. 1).

# Conclusiones.

## DEFICIENCIA DE HIERRO.

- \* La deficiencia de Fe provoca una disminución en el crecimiento en las amibas, por lo cual estas posiblemente estén sacrificando enzimas que contengan este metal para seguir creciendo y sobreviviendo.
- \* La aparición de un polipéptido de 88 kDa en amibas crecidas sin Fe extra (19  $\mu\text{M}$ ), el cual posiblemente se trate de un receptor de Fe ya que no aparece en amibas crecidas con más Fe (Fig. 4), o bien podría tratarse de una proteína de estrés por falta de Fe.
- \* Las amibas crecidas en deficiencia de Fe disminuyen la expresión de proteínas altamente conservadas como es la actina (Fig 4 y 6), mientras que la expresión de Hsp 70 mantiene prácticamente igual (Fig. 4) por lo cual esta podría tener un papel importante en la sobrevivencia a concentraciones bajas de hierro.

## EXCESO DE HIERRO

- \* *Entamoeba histolytica* al parecer soporta concentraciones altas del metal, sin un aparente daño.
- \* Al aumentar las concentraciones de Fe, aparece una proteína de 49 kDa que al parecer podría ser una proteína almacenadora de Fe o bien actuar como una nitrogenasa.
- \* La acumulación de Fe en las amibas crecidas en las concentraciones de 890  $\mu\text{M}$ . Fue dañina para el crecimiento al afectar al DNA y por tanto a la síntesis de proteínas, sin afectar la expresión de proteínas altamente conservadas como son actina y Hsp 70.
- \* La aparición de 3 proteínas de 162, 56 y 40 kDa (*¿Hsp?*) en concentraciones de 890  $\mu\text{M}$ , que posiblemente estarían protegiendo a la amiba del estrés generando por el exceso de Fe.

## VII. Apéndice.

### Medios de Cultivo.

#### Medio Diamond TYI-S-33:

|   |        |
|---|--------|
| Peptona Biotriptasa #10 (Dibico, Méx, D:F)  | 3 g    |
| Dextroxa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )                           | 1 g    |
| Cloruro de Sodio (NaCl)   | 0.2 g  |
| Cisteína (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S • HCl • H <sub>2</sub> O) | 0.1 g  |
| Fosfato dibasico de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )                      | 0.1 g  |
| Fosfato monobasico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )                    | 0.06 g |
| Ácido ascórbico (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> )                     | 0.02 g |
| Agua desionizada  | 82 ml  |

Para preparar 100 ml de medio Diamond se disuelven los componentes en un volumen menor a 82 ml de agua desionizada y una vez disueltos se ajusta a un pH = 6.80, con ayuda de hidróxido de sodio al 25%, después se afora a 82 ml y se agrega 2.24 mg de citrato férrico, finalmente se esteriliza en una olla de presión hasta 120 Kg/cm<sup>2</sup> durante 15 min. Este medio puede almacenarse por meses a -20 °C, una vez que se quiere usar debe ser enriquecido con 18 ml de una mezcla de suero de ternera (Microlab, Méx) (previamente descomplementado a 60 °C durante 30 min.) y vitaminas Tween 80 (In vitro, Méx) (la mezcla original es de 400 ml de suero de ternera y 50 ml de vitaminas).

**Medio Diamond con trazas de hierro:** Se siguen los mismos pasos para preparar el medio Diamond TYI-S-33, solo que no se le agrega citrato férrico amoniacal.

**Medio Diamond TYI-S-33 con diferentes concentraciones de hierro:** En este caso se representara a cada medio como: TYI<sub>2x</sub>-S-33, TYI<sub>5x</sub>-S-33, TYI<sub>10x</sub>-S-33, TYI<sub>15x</sub>-S-33 y TYI<sub>20x</sub>-S-33, a los cuales se le agregara respectivamente la cantidad de 4.48, 11.2, 22.4, 33.6 y 44.8 mg de citrato férrico amoniacal.

**Medio Diamond desferrado:** Para preparar este medio, no se adiciona citrato férrico amoniacal al medio, en su lugar se agregan 5 g/l de una resina quelante, Chelex-100 ® (Bio-Rad). Este medio con chelex se deja aproximadamente 18 hrs en agitación constante a 4 °C con el fin de eliminar cualquier traza de hierro y evitar el crecimiento microbiano, después se filtra el medio de cultivo con papel Watman # 4, se esteriliza y se enriquece con suero de ternera y vitaminas como anteriormente se explico para el medio TYI-S-33.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## Soluciones.

### ◆ Solución PBS 1x pH =7.

- 1 Se pesan 1.3 g de NaCl; 0.56 g de  $K_2HPO_4$  y 0.08 g de  $KH_2PO_4$ .
- 2 Se mezclan y se disuelven los componentes con un volumen menor a 200 ml.
- 3 Se ajusta el pH con NaOH 0.1 N añadiendo gota a gota y se afora la solución a 200 ml.
- 4 Finalmente se esteriliza en autoclave.

### ◆ Solución de tripano.

- 1 Se pesan 150 mg de azul de tripano y 120 mg de NaCl.
- 2 Se diluye en 25 ml de agua desionizada.
- 3 Se filtra en filtros millipore de 22  $\mu$ m.
- 4 Se almacena a congelación en alícuotas de 2 ml.
- 5 Finalmente se utilizan 300  $\mu$ l de la solución de azul de tripano para 100  $\mu$ l de suspensión celular.

## Cockel de inhibidores.

### ◆ Solución de Fenil Metil Sulfonil Floruro (PMSF) (PM= 174.2).

- 1 Pesar 0.01742 g de PMSF.
- 2 Se llevan a 1 ml con isopropanol en tubos eppendorf.
- 3 Se agregan unas pocas gotas de hidróxido de sodio (NaOH) 25%, si no se disuelve.
- 4 Se almacenan a -20 °C.

### ◆ Solución de para-hidroximercuribenzoato (pHMB) (PM= 360.7).

- 1 Pesar 0.18165 g de Tris-NaOH y se disuelven en un volumen menor a 10 ml de agua bidestilada.
- 2 Adicionar 0.3605 g de pHMB, agitar hasta disolver y aforar a 10 ml.
- 3 La solución se reparte en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf estériles y se almacenan a -20 °C.
- 4 La solución se descongela y se usa en cada ocasión.

### ◆ Solución de N-Etil-Maleinmida (NEM) (PM= 125.1).

- 1 Se pesan 0.01251 g de NEM.
- 2 Se llevan a 1 ml de agua desionizada en tubos eppendorf.
- 3 Se almacenan a -20 °C.

### ◆ Solución de ácido etilendiamil tetracetato ( $Na_2EDTA$ ) (PM= 292.2).

- 1 Se pesan 0.2922 g de  $Na_2EDTA$ .
- 2 Se disuelven en 10 ml de agua desionizada.

Una vez que están preparados los stocks, se utilizan las siguientes concentraciones:  
p-HMB 5 mM, NEM 5 mM, PMSF 12 mM y EDTA 10 mM.

### ◆ Preparación del reactivo de Bradford.

#### Reactivos.

|                        |                     | Conc. finales |
|------------------------|---------------------|---------------|
| Azul de Coomassie G250 | 100 mg              | 0.01% (w/v)   |
| Etanol al 95%          | 50 ml               | 4.7%          |
| Acido fosfórico        | 100 ml al 85% (w/v) | 8.5%          |
| Agua bidestilada       | cbp 1 lt            |               |

Se disuelven los primeros tres reactivos en un volumen menor a 1 litro de agua bidestilada, posteriormente se afora a un litro y se filtra en papel Whatman #4 y, se almacena en botellas color ambar a 4 °C.

### Curva de Calibración para Proteínas por el Método de Bradford (1976).

| MUESTRA #        | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| X. (µM) ALBUMINA | 1      | 5      | 10     | 15     | 20     | 25     | 30     |
| Y. ABS (560 NM)  | 0.0455 | 0.3126 | 0.5969 | 0.8213 | 0.9444 | 1.0889 | 1.2312 |
| Y. ABS AJUS.     | 0.1219 | 0.2878 | 0.4953 | 0.7027 | 0.9101 | 1.1175 | 1.3249 |

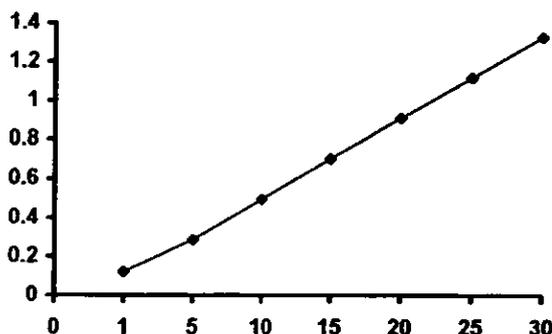


Figura A. Curva de calibración para la medición de proteínas por el método de Bradford. Se pesan 2 mg de albúmina bovina (Sigma) y se disuelven en dos mililitros de agua desionizada, de esta solución se toman 1,5,10,15,20,25 y 30 µl y se añaden a un mililitro de solución Bradford. Posteriormente se toman mediciones en el espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda, con el fin de realizar posteriormente con la ayuda de mínimos cuadrados el ajuste de la curva de calibración.

$$b = 0.080443172 \quad m = 0.041483534 \quad r = 0.984339004 \quad r^2 = 0.968923274$$

$$y = mx + b$$

Ecuación de la recta:  $y = 0.0415x + 0.0804$

## VIII. Bibliografía.

- \* Agarwal, S. y Sohal, S.R. (1994). DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 12332-12335.
- \* Archibald, F. (1983). *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. FEMS Microbiol. Lett. 19: 29-32.
- \* Atkin, C.L. Thelander, L. Reichar, P. y Lang, G. (1973). Iron and free radical in ribonucleotide reductase. J. Biol. Chem. 248: 7464-7472.
- \* Bakker-Grunwald, T. y Wöstmann, C. (1993). *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. Parasitology Today. 9 (1): 27-31.
- \* Beard, J. Green, W. Miller, L. y Finch, C.A. (1984). Effect of iron-deficiency anemia on hormone levels and thermoregulation during cold exposure. Am. J. Physiol. 247: R114-R119.
- \* Blemond, P. Swaak, A.J. Van Eijk, H.G. y Koster, J.F. (1988). Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory disease. Free. Radic. Biol. Med. 4: 185-198.
- \* Bolann, B.J. y Ulvic, R.J. (1990). The limited ability of superoxide to release iron from ferritin. Eur. J. Biochem. 193: 899-904.
- \* Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
- \* Brumpt, E. (1925). Étude sommaire de l' *Entamoeba dispar* n. sp. Amibe à kystes quadrinucléés, parasite de l'homme. Bull Acad. Méd. (Paris). 94 : 943-952.
- \* Bullen, J.J. (1981). The significance of iron in infection. Rev. Infect. Dis. 3: 1127-1138.
- \* Bullen, J.J. Ward, C.G. y Rogers. H.J. (1991). The critical role of iron in some clinical infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10: 613-617.
- \* Burrows, R.B. (1957). *Entamoeba hartmanii*. Am. J. Hyg. 172-188.
- \* Buttke, T.M. y Sadstrom. P.A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunology Today. 15: 7-10.
- \* Carlsson, J. (1984). Degradation of albumin, haemopexin, haptoglobin and transferrin, by black pigmented bacteroides species. J. Med. Microbiol. 18: 39-46.
- \* Caroline, A. (1996). Iron acquisition in the pathogenic *Neisseria*. Trends in Microbiology. 4 (5): 179-184.

- \* Cerecedo-Cortina, B.V. Cerecedo, O.J.F. y Castillo, R.G. (1996). Amibiasis: Estudios endoscópicos. *Acta Médica*. 31: 21-27.
- \* Chávez, B. Martínez -Palomo, A. y de la Torre, M. (1978). Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de *Entamoeba invadens*, *E. histolytica* y *E. coli*. *Arch. Invest. Med (Méx.)*. 9 (Supp, 1): 113-116.
- \* Conde-Bonfil, M.C. y De la Mora-Zerpa, C. (1992). *Entamoeba histolytica* : un desafío vigente. *Salud Publica Méx.* 34 : 335-341.
- \* Cooper, E.C. Lynagh, R.G. Hoyes, P.K. Hider, C.R. Cammack, R. y Porter, B.J. (1996). The relationship of intracellular iron chelation to the inhibition and regeneration of human ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 271: 20291-20299.
- \* Correa, P. Arias-Stella, J. Pérez, T.R. y Carbonell, M.L. (1980). Texto de patología. 4° Ed. La prensa Médica Mexicana. México. 339.
- \* Crichton, R.R. (1991). *Inorganic biochemistry of iron metabolism*. Ellis Horwood. Great Britain. 263: 190-212.
- \* Davies, K.J.A. Donovan, C.M. Refino, G.A. Brooks G.A. Packer, L. y Dallman, P.R. (1984). Distinguishing effects of anemia and muscle iron deficiency on exercise bioenergetics in the rat. *Am. J. Physiol.* 246, E535-E543.
- \* De la Torre, M. De la Hoz-Couturier, R. Landa, L. y Sepúlveda, B. (1971). Cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd.* 2: 165-172.
- \* Diamond, S.L. Harlow, D.R. y Lunnik, C.C. (1978 a). A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72: 431-438.
- \* Diamond, S.L. Harlow, R.D. Philips, P.B. y Keister, B.D. (1978 b). *Entamoeba histolytica* iron and nutritional immunity. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*. 9: 329-338.
- \* Diamond, S.L. y Clark, G. (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walter, 1911) Separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J. Euk. Microbiol.* 40 (3) : 340-344.
- \* Douvas, S.G. May, H.M. y Crowle, J.A. (1993). Transferrin, iron, and serum lipids enhance or inhibit *Mycobacterium avium* replication in human macrophages. *J. Infect. Dis.* 167: 857-864.
- \* Drubin, D. y Hirokawa, N. (1998). Cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology.* 10: 13-15.
- \* Garcia-Manzo, N.T. (1990). Clinical spectrum of amebiasis in adults. In Kretschmer, R.R. *Amebiasis: Infection and Disease by Entamoeba histolytica*. CRC Press Boca Raton, Florida. U.S.A. 191-208.

- \* **Gómez, A.A.V.** Soto, H.B. Rivera, G.J.L. y González, S.E. (1995). Tratamiento del absceso hepático amibiano en niños. Revisión de 20 casos. Rev. Med. IMSS (Méx.). 33: 67-72.
- \* **Gutiérrez, G.** (1987). Investigaciones mexicanas sobre vacunas. Amibiasis. Epidemiologia. 2:125-133.
- \* **Gutiérrez, G.** y Muñoz, O. (1991). Amibiasis Intestinal. Epidemiologia. 6: 57-71.
- \* **Gutteridge, J.M.C.** Rowley, D.A. y Halliwell, B. (1982). Superoxide dependent formation of hydroxyl radical and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Biochem J. 206: 605-609.
- \* **Farber, J.L.** (1980). Bacterial defense against oxidative stress. Chem. Res.Tox. 3: 503-508.
- \* **González-Ruiz, A.** (1990). Revisión del estado actual del diagnóstico diferencial de las amibas en México. Salud Publica de México. 32 : 589-596.
- \* **Halliwell, B.** y Aruoma, O.I. (1991). DNA damage by oxigen-derived species. FEBS Lett. 281: 9-19.
- \* **Halliwell, B.** y Gutteridge, J.M.C. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation-an update. FEBS Lett. 307: 108-112.
- \* **Hall, A.** (1998). Rho GTPases and actin cytoskeleton. Science. 279: 509-514.
- \* **Henle, E.S.** Luu, Y. y Linn, S. (1996). Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> and oxygen react with DNA-derived radicals formed during iron-mediated fenton reactions. Biochemistry. 35: 12212-12219.
- \* **Hentze, W.M.** y Kühn, C.L. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. Proc. Natl.Acad Sci. USA. 93: 8175-8182.
- \* **Keyer, K.** y Imlay, J.A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. Proc. Natl. Acad Sci. USA. 93: 13635-13640.
- \* **Kochan, I.** Golden, C.A. y Bukovic, J.A. (1969). Mechanism of tuberculostasis in mammalian serum. II. Induction of serum tuberculostasis in guinea pigs. J. Bact. 100: 64-70.
- \* **Kochan, I.** Cahall, D.L. y Golden, C.A. (1971). Employment of tuberculostasis in serum agar medium for the study of production and activity of mycobactin. Infect. Immun. 4: 130-137.
- \* **Laemmli, U.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 17: 203-209.
- \* **Latour, G.N.** y Reeves, E.R. (1965). An Iron-Requirement for Growth of *Entamoeba histolytica* in Culture, and the Antiamoebal Activity of 7-Iodo-8-Hydroxy-Quinoline-S-Sulfonic Ácid. Exp. Parasitol. 17: 203-209.

- \* Lawrence, J. y Bendich, A. (1987). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Faseb. J.* 1: 441-445.
- \* Lee, P.C. Bochner, B.R. y Ames, B.N. (1983). AppppA, heat-shock stress, and cell oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 7496-500.
- \* Lindquist, S. y Craig, E.A. (1988). The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-677.
- \* Lozoff, B. (1988). Behavioral alterations in iron deficiency. *Adv. Pediatr.* 35: 331-359.
- \* Manríquez-Saide, P.C. y Delfin-González, H. (1997). Importancia de las moscas como vectores potenciales de enfermedades diarreicas en humanos. *Rev. Biomed.* 8: 163-170.
- \* Martínez-Palomo, A. (1987). The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitology Today.* 3: 11-18.
- \* Martínez, P.J.A. y Gutiérrez, E.M. (1987). Introducción a la protozoología. Ed. Trillas. México. 207.
- \* McCord, J.M. (1974). Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science.* 185: 529-531.
- \* McCord, J.M. (1996). Effects of positive iron status at a cellular level. *Nutr. Rev.* 54: 85-88.
- \* McLaughlin, J. y Aley, S. (1985). The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *J. Protozoology.* 32 (2): 221-240.
- \* Miale, J.B. (1985). Hematología. Medicina de laboratorio. Ed. Reverte. Barcelona España. 1168.
- \* Mortenson, E.L. y Thorneley, N.F.R. (1979). Structure and function of nitrogenase. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 387-418.
- \* Neal, R.A. (1966). Experimental studies on *Entamoeba* with special reference to speciation. *Adv. Parasitol.* 4: 1-15.
- \* Neilands, J.B. (1981). Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 715-731.
- \* Neilands, J.B. (1994). Identification and isolation of mutants defective in iron acquisition. *Methods Enzymol. Rev.* 235: 352-356.
- \* Neva, A.F y Brown, W.B. (1994). Basic clinical parasitology. 6ª edición. Ed. Appleton & Lange. U.S.A. 356.
- \* Ogunnariwo, J.A. y Schryvers, A.B. (1990). Iron acquisition in *Pasteurella haemolytica*: Expression and identification of bovine-specific transferrin receptor. *Infect. Immun.* 58: 2091-2097.

- \* Ortner, S. Plaimauer, B. Binder, M. Wiedermann, G. Scheiner, O. y Duchène, M. (1992). Humoral immune response against a 70-kilodalton heat shock protein of *Entamoeba histolytica* in a group of patients with invasive amoebiasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54: 175-183.
- \* Otto, B.R. Verwerj-Van Vught, A.M.J.J. y McLaren, D.M. (1992). Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Critical Rev. Microbiol.* 18: 217-233.
- \* Padmanaban, G. y Sarma, P.S. (1965). Studies on iron metabolism in *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 111: 147-152.
- \* Ravdin, J.I. y Guerrant, R.L. (1982). A review of the parasite cellular mechanism involved in the pathogenesis of amebiasis. *Rev. Infect. Dis.* 4: 1185-1207.
- \* Reeves, E.R. Guthrie, D.J. y Lobelle-Rich, P. (1980). *Entamoeba histolytica*: Isolation of ferredoxin. *Exp. parasitol.* 49: 83-88.
- \* Robbins, L.S. (1990). Patología funcional y estructural. 4 Ed. Vol. 1. Interamericana. Mc-Graw-Hill. España. 639.
- \* Rouault, A.T. y Klausner, D.R. (1996). Iron sulfur clusters as biosensors of oxidants and iron. *Trends. Biochem. Sci.* 21: 174-177.
- \* Serrano, L.J.J. (1997). Importancia del hierro para *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS. Tesis de doctorado. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional (CINVESTAV). 47.
- \* Schade, A.L. (1963). Significance of serum iron for the growth, biological characteristics, and metabolism of *Stahylococcus aureus*. *Biochem Z.* 338: 140-148
- \* Smith, J.M. y Meerovitch E. (1982). Specificity of iron requirements of *Entamoeba histolytica* in vitro. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*. 13: 63-69.
- \* Stein, H.J. (1991). Medicina Interna. 3ª Ed. Tomo I. Salvat. México, D.F. 1256.
- \* Stifel, I.E. y Watt, D.G. (1979). *Azotobacter* cytochrome  $b_{557.5}$  is a bacterioferritina. *Nature.* 42: 779-781.
- \* Stookel, L.L. (1970). Ferrozine-A new spectrophotometer reagent for iron. *Anal Chem.* 42: 779-785.
- \* Tannich, E. y Bruchhaus, I. (1994). Induction of the iron-containing superoxide dismutase in *Entamoeba histolytica* by a superoxide anion-generating system or by iron chelation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67: 281-288.
- \* Tay, J. Gutiérrez, M. y Alvarez, T. (1996). Frecuencia de las parasitosis intestinales en cuatro escuelas de Morelia, Michoacán. *Rev. Fac. Med. (UNAM)*. 39: 41-43.

- ✿ Thauer, K.R. y Schönheit, P. (1982). Iron-Sulfur complexes of ferredoxin as a storage form of iron in *Clostridium pasteurianum*. In Spiro, G.T. Iron-Sulfur proteins. John Wiley & Sons. U.S.A. 434.
- ✿ Theodore, T.S. y Shade, A.L. (1965). Carbohydrate metabolism of iron-rich and iron-poor *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. 40: 385-389.
- ✿ Thelander, L. y Reichard, P. (1979). Reduction of ribonucleotides. Ann. Rev Biochem. 48: 133-158.
- ✿ Thomas, C.E. Morehouse, L.A. y Aust, S.D. (1985). Ferritin and superoxide dependent lipid peroxidation. J. Biol. Chem. 260: 3275-3280.
- ✿ Trissl, D. (1982). Immunology of *Entamoeba histolytica* in human animals hosts. Rev. Infect. Dis. 4: 1154-1184.
- ✿ Walsh, J.A. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8: 228-237.
- ✿ Walter, B.J. y Davies, E.J. (1981). Medical parasitology. 3° edición. Ed. Mosby. 355.
- ✿ Waring, W.S. y Warkman, C.H. (1944). Iron deficiency in bacterial metabolism. Arch. Biochem. 4: 75-78.
- ✿ Watson, W.S. Morrison, J. y Bethel, M.I.F. (1986). Food iron and lead absorption in humans. Am. J. Clin. Nutr. 44: 248-256.
- ✿ Wayne, W. F. (1988). Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. Methods in Enzymology. 158: 357-364.
- ✿ Weinbach, E.C. Harlow, D.R. Claggett, E.C. y Diamond, L.S. (1977). *Entamoeba histolytica*: Diaphorase activities. Exp. Parasitology. 41 : 186-197
- ✿ Weinbach, E.C. Takevchi, T. Claggett, E.C. Inohue, F. Kon, H. y Diamond, L.S. (1980). Role of iron-sulfur protein in the electron transport system of *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Méd. 11 (suppl. 1): 75-85.
- ✿ Weinbach, E. C. (1981). Biochemistry of enteric parasitic protozoa. Trends Biochem. Sci. 6: 254-257.
- ✿ Weinberg, E.D. (1971). Roles of iron in host-parasite interactions. J. Infect. Dis. 124: 401-410.
- ✿ Weinberg, E.D. (1978). Iron and infection. Microbiol. Rev. 42: 45-66.
- ✿ Weinberg, E.D. (1990). Cellular iron metabolism in health and disease. Drug. Metab. Rev. 22: 531-579.

- \* Weinberg, E.D. (1993). The Iron- Withholding Defense Sistem. ASM News. 59 (11): 559-562.
- \* Williams, R.J.P. (1982). Free manganese (III) and iron (II) cations can act as intracellular cell controls. FEBS. Lett. 140: 3-10.
- \* Winder, F.G. y O'Hara, C. (1962). Effects of iron deficiency and of zinc deficiency on the composition of *Mycobacterium smegmatis*. Biochem. J. 82: 98-102.
- \* Wooldrige, G.K. y Williams H.P. (1993). Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. FEMS. Microbiol. Rev. 12: 325-348.
- \* Wulf, E. Dedoben, A. Bautz, F.A. y Wieland, T. (1979). Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. Proc. Natl. Acad Sci. USA. 76: 4498-4502.
- \* Ximénez, C. Melendro, E. y Ramiro, M. (1993). Amibiasis intestinal. Temas de Medicina Interna. 1: 583-599.
- \* Yamamoto, S. Hara, Y. Tomochika, K. y Shinoda, S. (1995). Utilization of hemin and hemoglobin as iron sources by *Vibrio parahaemolyticus* and identification of an iron represible hemin-binding protein. FEMS. Microbiology Letters. 128: 195-200.
- \* Zhang, Y. Marcillat, O. Giulivi, C. Ernster, L. y Davies, K.J.A. (1990). The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. J. Biol. Chem. 265: 16330-16336.