

38
201

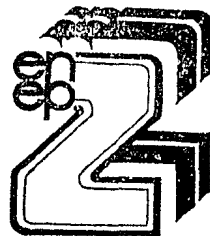


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

Determinación de la Actividad Enzimática de
Entamoeba histolytica después de Adicionar
"Colopahtle" (Zanthoxylum liebmaniarum)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ALEJANDRO TAMAYO DURAN



México, D. F.

1985



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.

I N D I C E

Pág

INTRODUCCION

LISTA DE ABREVIATURAS

C A P I T U L O I

1. GENERALIDADES.

1.1. Antecedentes históricos	2
1.2. Historia de la amibiasis en México	4
1.3. Morfología y ciclo Biológico	10
1.4. Patogenicidad	13

C A P I T U L O II

2. PARTE TEORICA

2.1. Fundamentación del tema	16
2.2. Actividad enzimática de la <u>E. histolytica</u>	20
2.3. Planteamiento del problema	22
2.4. Objetivos	23
2.5. Hipótesis	24

C A P I T U L O III

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipo	26
3.2. Material de vidrio	27
3.3. <u>Material Biológico</u>	
3.3.1. <u>E. histolytica</u> cepa HM-1 IMSS.	28
3.4. <u>Metodología</u>	

	Pág.
3.4.1. Cultivo axénico de <u>E. histolytica</u>	29
3.4.2. Pruebas de esterilidad	32
3.4.3. Inoculación de trofozoítos al medio de cultivo	33
3.4.4. Cálculo del número total de trofozoítos.	34
3.4.5. Recolección, lavado y determinación de la viabilidad de los trofozoítos.	35
3.5. Investigación de los cambios en el patrón electroforético isoenzimático de <u>E. histolytica</u> con <u>Zonothoxylum liebmaniarum</u> .	
3.5.1. Utilizando diferentes concentraciones en dosis única de Colopahtle.	36
3.5.2. Utilizando diferentes concentraciones en dosis repetitivas de Colopahtle	37
3.5.3. <u>Determinaciones enzimáticas.</u>	
3.5.3.1. Preparación de los lisados	39
3.5.3.2. Determinación de H K	40
3.5.3.3. Determinación de P G I	42
3.5.3.4. Determinación de P G M	44

C A P I T U L O I V

RESULTADOS	46
----------------------	----

C A P I T U L O V

RESUMEN DE RESULTADOS	53
---------------------------------	----

	Pág.
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA	61

INTRODUCCION

El uso de fármacos antiparasitarios, como el Metronidazol, Hemezol (21) Timidazol (52), derivados del 2-metil, 5-nitro, imidazol, son utilizados ampliamente en la quimioterapia de la amibiasis intestinal; sin embargo en México, el uso de productos naturales de origen vegetal, en el tratamiento de algunas enfermedades parasitarias se basa en el conocimiento empírico popular. Este es el caso del Zanthoxylum liebmaniarum (Colopahtle) (51), su uso como agente amebicida se reduce a los habitantes de la sierra de Puebla, los cuales por tradición popular lo han venido utilizando cuando presentan sintomatología intestinal atribuible al cuadro nosológico de la amibiasis, con la consecuente mejoría en su estado patológico.

Pruebas farmacológicas preliminares del Zanthoxylum liebmaniarum (Colopahtle) demostraron que no se modificó ni el número ni la viabilidad de las amibas cultivadas en presencia de extractos de este vegetal, observándose sólo alteraciones en su morfología.

La actividad enzimática de las amibas sometidas a un tratamiento con productos amebicidas, no ha sido estudiada, lo que nos sugirió cultivar a las amibas en presencia de extractos de Colopahtle y posteriormente investigar el patrón electroforético isoenzimático de la hexocinasa, fosfoglucoisomerasa y la fosfoglucomutasa, ya que como es bien conocido, este patrón es considerado como un determinante de patogenicidad.

dad, de acuerdo a estudios de correlación clínica realizados por Sargeant y Jiménez (59).

Esta investigación se encuentra apoyada en las modificaciones observadas, experimentalmente, en el patrón electroforético isoenzimático de amibas sometidas a tratamientos mutagenéticos con luz ultravioleta y 6-mercaptopurina (63), en las cuales fue posible cambiar su patrón isoenzimático, si sucede lo mismo con el Colopahtle, éste sería un arma terapéutica, ya que el pronóstico y el tratamiento sería diferente. - La primera parte de esta idea se realizó y pensamos que en un futuro pueda continuarse trabajando.

LISTA DE ABREVIATURAS

- H K.- Hexocinasa.
- P G I .- Fosfoglucoisomerasa.
- P G M.- Fosfoglucomutasa.
- E D T A.- Acido etilen diamino tetracético.
- A T P.- Adenosin trifosfato.
- G 6 P D.- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.
- A D P.- Adenosin difosfato.
- G 1 P.- Glucosa 1-fosfato.
- F 6 P.- Fructuosa 6-fosfato.
- P M S.- Metosulfanato de fenazina.
- M T T.- Azul de tiazolil.
- N A D P.- Nicotin adenin difosfato.
- CEPA HM-1.- Cepa de Entamoeba histolytica extraída de un absceso hepático amibiano.

C A P I T U L O I

1. GENERALIDADES

1.1. Antecedentes Históricos.

Wilhelm Lambl en 1860 (31) observó a la Entamoeba histolytica en las heces de niños afectados por disentería, siendo la primera referencia directa de la amiba como probable -- causa de este padecimiento humano, atribuyéndole ciertos síntomas; una observación semejante fue hecha por Morris J. Lewis (37) quien al estudiar casos de "cólera" en la India, encontró y estudió a la Entamoeba histolytica, atribuyéndole también algunos síntomas. Pero el mérito, no sólo del descubrimiento, sino también de haber ofrecido la primera prueba experimental de su carácter patógeno, pertenece por completo a -- Friederich Lösch, médico Ruso que trabajaba en San Petesburgo hoy Leningrado, quien en 1875 publicó en Alemania sus observaciones (38). Al examinar materias fecales observó un gran número de microorganismos, intrigado por su presencia los dibujó con detalle, de modo que en sus ilustraciones es posible -- distinguir trofozoítos de Entamoeba histolytica. Hizo una -- autopsia parcial, recuperó el intestino, lo abrió cuidadosamente e identificó úlceras, más numerosas en la porción terminal al hacer raspados de las úlceras volvió a observar la presencia de innumerables amibas; hizo varios intentos por cultivarla pero fueron negativos; posteriormente administró por -- vía bucal, en forma de enema, raspados de las úlceras intestinales del paciente a cuatro perros, reproduciendo la enfermedad e identificando los mismos parásitos del enfermo en uno --

de los perros. Por último propone el término de Amoeba coli para el parásito, mismo que siguió usándose hasta 1903 cuando Schaudinn (60) con sus publicaciones permitió distinguir entre los dos tipos de protozoarios.

Koch (29) identificó amibas en abscesos hepáticos de - casos provenientes de Egipto, y sugirió que los parásitos podían tener relación patógena con la enfermedad. Kartulis (27) examinó 150 casos de disentería e identifica amibas idénticas a las de Lösch en heces fecales de todos ellos y posteriormente observó los mismos parásitos en lesiones cerebrales (28).- Hlava en su trabajo "Sobre la disentería. Observaciones preliminares" (22) examina casos de disentería en Praga, en los cuales identificó amibas en las materias fecales, reprodujo - la enfermedad en dos de diecisiete perros y en cuatro de seis gatos en los que introdujo el parásito por vía rectal.

W.T. Councilman y H.A. Lafleur (9) publicaron su famosa monografía "Amoebic dysentery", basada en catorce casos observados clínica y anatómicamente; y concluyeron, que el padecimiento es una entidad anatomoclínica bien definida y el - agente patógeno es la amiba.

1.2. Historia de la amibiasis en México.

No se sabe si la amibiasis existía en México antes de la conquista o después de ella (19), ya que los datos existentes de los siglos XVI y XVII indican que la enfermedad atacaba tanto a los indios como a los españoles; el primer caso -- descrito es el del Arzobispo de México y Virrey de la Nueva España, Fray García Guerra, en el año de 1612. En el siglo XVII la enfermedad adquiere un carácter epidémico, aunque por el desconocimiento de la etiología la intervención quirúrgica proporcionó alivio, pero fue infructuoso en numerosas ocasiones.

El Dr. M.F. Jiménez (25) trata de precisar la terapéutica y fija la sintomatología de la enfermedad, inferida de 297 casos, establece un pronóstico exacto y deduce las bases diagnósticas. Brassetti (5) compara los métodos curativos -- del absceso hepático dividido en dos, los europeos y los nacionales, entre los primeros señala la incisión y los cáusticos, y entre los nacionales a los del Dr. Jiménez, los cuales son supurativos, señalando las ventajas que tienen sobre los europeos.

Zamora (68) habla del proceso de como una hepatitis su purada, así se le conocía antiguamente al absceso hepático -- amibiano, es producida por congestión grave ocasionada por -- desórdenes en la ingestión de ciertos alimentos de difícil di gestión y a la abundancia de bebidas alcohólicas y principalmente del pulque.

Larios (32) encuentra un absceso hepático abierto al estómago, donde el paciente presenta primeramente, urticaria generalizada, después síntomas digestivos, especialmente diarreas y por último signos de absceso hepático. Sivla (62) refiere el caso de un enfermo en el que faltaban muchos de los signos francos y fáciles de apreciar, que denuncian un absceso hepático, y al cual se le extrajeron grandes cantidades de pus, de un tumor en el epigastrio, con todas las características.

Prieto (46) divide las conexiones existentes entre disentería y absceso hepático en dos clases: 1) aquellos casos que por su naturaleza fueron denominados disentería hepática y 2) el hecho de observar ulceraciones intestinales, permite plantear la posibilidad de entrada a la circulación porta de los principios sépticos, bacterias o protozoarios, los que -- sin haber provocado disentería, pueden ser responsables de la instalación del absceso; dice haber encontrado en el pus leucocitos, glóbulos rojos, gotitas y granulaciones de grasa, -- otras granulaciones, cristales de hematoïdina y frecuentemente amibas. La intervención directa de las amibas es indispensable para provocar la supuración.

Pruneda(48) en 1905 dice que es importante el estudio de la fórmula leucocitaria en el diagnóstico del absceso hepático informando que los pacientes presentan leucocitosis.

Mendizábal (41) es la primera persona en México que señala la importancia del empleo de la emetina, empleando palabras como absceso amibico. Alarcón (1) habla de la desinte--

ría amibiana, del paso de la infección del intestino al hígado y de éste al pulmón, menciona el síndrome hepato-pulmonar-amibiano, el cual se presenta alrededor de la época en que la amibiasis, originalmente implantada en el colon, ha pasado -- por la etapa hepática y se encuentra a punto de invadir o ha invadido el parénquima pulmonar.

Fournier y colaboradores (20) introducen el uso del difosfato de cloroquina obteniendo mejores resultados que con el uso de la emetina, ya que la cloroquina no produce intolerancia, no afecta al miocardio y se observa una mejoría más rápida.

Sepúlveda y Junich (61) observan 1556 individuos parasitados con Entamoeba histolytica, clasificando a la infección según el cuadro de lesiones anatomopatológicas y los dividen en: a) hepatitis aguda, b) absceso agudo y c) absceso crónico. Esta clasificación es dependiendo de la intensidad del cuadro patológico.

Ramos y Haro (49) hacen un análisis estadístico de 197 casos de amibiasis encontrando que 76.6% se da en hombres y el 23.4% en mujeres, la mayor frecuencia es entre los 30 y 40 años, el alcoholismo es positivo en el 63% de los casos, negativos en el 23% y ocasional en el 14%.

DEFINICIONES

Se entiende por amibiasis invasora (54) todos los casos donde hay procesos patológicos causados por la penetración de amibas patógenas a los tejidos del hombre; este término no es más preciso que el de amibiasis, ya que hay amibas patógenas y amibas no patógenas (57) en el intestino del hombre, esto indica que hay personas que albergan Entamoeba histolytica y no presentan síntomas o lesiones atribuibles al parásito, éstos son los portadores sanos.

Por largo tiempo se pensó que la Entamoeba histolytica era un parásito obligatorio del hombre y su presencia en el intestino significaba un estado patológico (10,12). Recientemente se ha modificado el criterio y la opinión, generalmente aceptada es que E. histolytica vive en calidad de comensal en el intestino del hombre, bajo la forma llamada minuta, prequística o tetrágena (11,12,66), la cual es la forma no invasora y forma quistes; en estas condiciones se nutre con bacterias y sustancias del contenido intestinal, sin invadir tejidos.

Por circunstancias, todavía desconocidas, la forma minuta aumenta de tamaño, fagocita glóbulos rojos y penetra a los tejidos; en estas circunstancias la Entamoeba histolytica es invasora e incapaz de formar quistes.

De acuerdo con esta interpretación el parásito tiene, probablemente, dos ciclos biológicos, en los cuales uno es pa

tógeno y no forma quistes, el otro no es patógeno y presenta la formación de quistes.

La opinión expresada con anterioridad sobre las formas comensales y patógenas, tiene una serie de hechos clínicos y experimentales que la apoyan (2,11,66), y de acuerdo con ello, el protozooario es un parásito facultativo, el cual, según las circunstancias, puede ser inocuo o tener la capacidad de destruir tejidos.

El término zimodemo es el que se refiere a la comparación de los patrones electroforéticos isoenzimáticos de las amibas, las cuales morfológicamente son idénticas, pero presentan diferencias en éste; la clasificación por zimodemos es muy útil ya que pone de manifiesto las diferencias en su grado de patogenicidad (55,56,57).

El patrón electroforético isoenzimático es la representación esquemática de tres enzimas, la HK, FGI y FGM, las cuales tienen un patrón específico para cada zimodemo, y por este medio podemos determinar los diferentes grados de patogenicidad existentes (3).

Las isoenzimas son aquellas enzimas que existen en múltiples formas moleculares, en una misma especie o dentro de una misma célula. Tales formas múltiples pueden ponerse de manifiesto, así como separarse, mediante electroforesis en gel de extractos celulares; se deduce de ello que son especies moleculares distintas que difieren en su carga eléctrica.

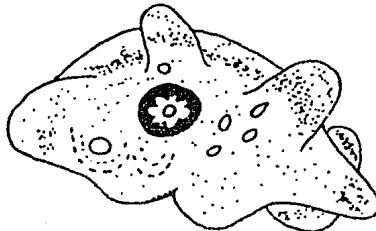
Esta propiedad isoenzimática es aprovechada para diferenciar los diferentes tipos de amibas que existen ya que las amibas patógenas tienen diferentes isoenzimas y éstas no están presentes en las no patógenas (25).

1.3. Morfología y ciclo Biológico.

La amibiiasis es una enfermedad causada por el agente - etiológico llamado Entamoeba histolytica (9), el cual es un - protozooario de la clase Rhizopoda y del género Entamoeba. El ciclo biológico de este parásito es muy complejo y en él se - producen algunos cambios en su morfología, siendo las formas - más importantes, desde el punto de vista médico, el quiste y - el trofozoito o forma móvil (54).

El trofozoito tiene formas y dimensiones variables (56) que fluctúan entre 10 y 60 micras de diámetro, y en prepara-- ciones teñidas muestra una membrana citoplasmática delgada; - el contenido se divide, clásicamente, en dos porciones: una - zona externa o exoplásmica, que es más clara y que da lugar a los pseudópodos, y una zona interna o endoplasma, finamente - granular y con muchas vacuolas. El núcleo ocupa, aproximada-- mente, una quinta parte del volumen celular y aparece como -- una esfera central rodeada de una membrana delgada dispuesta - en masas irregulares. El nucleolo es prominente y con fre- - cuencia está en el núcleo, esto puede ser observado en la fi- - gura 1.

FIGURA 1

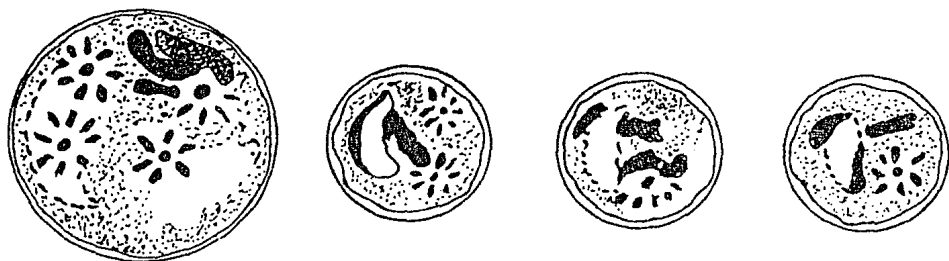


TROFOZOITO DE ENTAMOEBIA HISTOLYTICA

No se ha encontrado ninguna diferencia morfológica, ni antígena en los trofozoítos de E. histolytica aislados de portadores asintomáticos y los obtenidos de lesiones amebianas humanas (29,64).

En preparaciones no teñidas los quistes miden de 3.5 a 25 micras de diámetro; en tinciones adecuadas, como la tinción de Sargeant (54), muestra de uno a ocho núcleos pero lo más común es que presenta cuatro núcleos redondos con bordes lisos y condensaciones de cromatina agregados sobre la superficie interna, con un núcleo central formando por uno o varios gránulos dispuestos en un órgano compacto, como lo muestra la figura 2.

FIGURA 2



QUISTE DE E. HISTOLYTICA

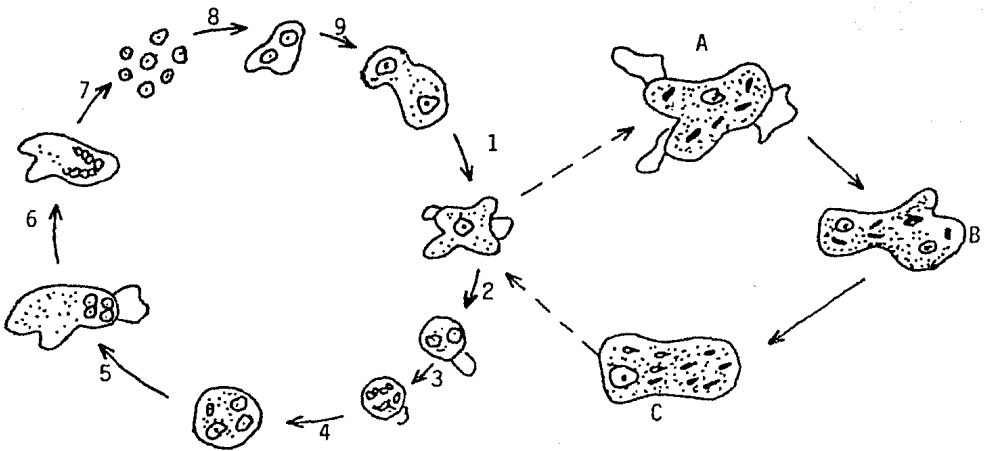
CICLO BIOLÓGICO.

La Entamoeba histolytica tiene, probablemente, dos ciclos biológicos; uno no patógeno durante el cual vive en la mucosa o en la luz del intestino, se nutre de otros microorganismos y de restos alimenticios y forma quistes, el otro ci--

clo es patógeno y durante éste vive en el espesor de los tejidos, se alimenta de los productos de la histólisis, adopta -- únicamente la forma de trofozoíto y se multiplica por división, pero sin producir quistes.

Aun cuando la existencia de estos dos ciclos es generalmente aceptada, no está demostrada la transformación de la fase no patógena en patógena y viceversa, en la figura 3 se muestran los dos ciclos y la transformación se señala con líneas interrumpidas.

FIGURA 3



CICLO NO PATOGENO

- 1.- Trofozoíto de E. histolytica
- 2.- Prequiste.
- 3.- Quiste binucleado.
- 4.- Quiste cuadricleado.
- 5.- Amiba metaquística.
- 6.- Amiba multinucleada.
- 7.- Pequeñas amibas.
- 8.- Inicio de la división.
- 9.- Terminación de la división.

CICLO PATOGENO

- (A) Trofozoíto hematófago (invasor).
- (B) Trofozoíto hematófago en proceso de división.
- (C) Trofozoíto hematófago e invasor que da origen a la forma minuta no invasora.

1.4. Patogenicidad.

La Entamoeba histolytica es un parásito del hombre, -- que juzgado a través de un criterio morfológico, no podemos -- conocer las razones por las cuales el mismo organismo se en-- cuenta en pacientes clínicos con invasión de tejidos, así co-- mo en individuos asintomáticos (56). Los factores que deter-- minan estas diferencias son poco conocidos.

Existen tres factores que influyen para que una amiba-- se transforme de comensal en patógena (54), estos factores -- son:

- a) Factores dependientes del parásito.
- b) Factores dependientes del huésped.
- c) Otros factores.

Sin embargo no es posible poder comprobar, en forma de finitiva, el hecho de que estos factores influyan en la pato-- genia de la amibiasis invasora. Ahora bien, si aplicamos el-- criterio morfológico no hay explicación al hecho de que este-- parásito se pueda presentar, tanto en pacientes con la patolo-- gía descrita para la amibiasis con invasividad de órganos (23, 30,54), así como en pacientes sin patología digestiva (4,14).

Por estas razones es necesario utilizar otra metodolo-- gía que permita distinguir diferentes tipos de amibas (55,57, 59). La clasificación de parásitos mediante la utilización -- de electroforesis fue iniciada por Bragster (50) con tripano-- somas, y en el caso de Entamoeba histolytica por Reeves y Bi

choff (50) donde utilizaron electroforesis en acetato de celulosa de las enzimas glucocinasa, fosfoglucoisomerasa, fosfoglucomutasa, L-malato oxidoreductasa y una diaforasa de NADP, diferenciando dos grupos en diez cepas de Entamoeba histolytica.

Años más tarde Sargeant (56,57,59) utiliza el método de Wrxal y Culliford (67), clasifica en zimodemos cepas de la India, México y Sudáfrica utilizando para ello el esquema electroforético de cuatro enzimas en gel de almidón, estas enzimas son: la fosfoglucoisomerasa, la fosfoglucomutasa, la L-malato oxidoreductasa y la hexocinasa.

En México se encontraron dieciocho zimodemos de Entamoeba histolytica, el cual es un número mayor a los encontrados anteriormente, en donde los trabajos de correlación clínica realizados por Jiménez (26) establecieron que el zimodemo II corresponde a una amiba invasora, los zimodemos VI, VII, XIII y XIV producen algunos trastornos digestivos, pero nunca invaden tejidos, los demás son comensales; quedando demostrado que hay diferentes grados de patogenicidad.

CAPITULO II

2. PARTE TEORICA

2.1. Fundamentación del tema.

La amibiasis en México, constituye uno de los problemas de salud más importantes, la tasa de infección del 20% revela que los sistemas de salud así como el nivel educacional del país es todavía deficiente. Por otro lado el tratamiento con diversos fármacos revela que éstos son tóxicos y en muchas ocasiones no muy efectivos (30).

La parasitosis intestinal fue una de las causas principales de consulta en 1982 y en primer término destacó la amibiasis invasora con 882,033 casos, siendo este número el 6% de todos los casos atendidos, ocupando el cuarto lugar en incidencia. Este porcentaje puede ser reducido por el uso de antiparasitarios adecuados, así como por el saneamiento ambiental y la educación higiénica de las comunidades más afectadas.

Los siguientes datos estadísticos fueron consultados en el "Boletín epidemiológico", editado por el IMSS en el año de 1982.

Los casos de amibiasis por años de 1972 a 1982 se presentan en la tabla I.

TABLA I

Año	1972	1973	1974	1975	1976
N° de casos	126040	258730	323728	361446	398955
Año	1977	1978	1979	1980	1981
N° de casos	494139	518449	516260	619396	801249
Año 1982, N° de casos 882033					

Durante el año de 1982, los meses de más número de casos reportados, se muestran en la tabla II.

TABLA II

Mes	Julio	Agosto	Septiembre
N° de casos	87912	78841	83511

Los estados de mayor incidencia, durante el mismo año, están en la tabla III.

TABLA III

Estado	Coahuila	Aguascalientes
N° de casos	24850	11320
%	2.81	1.28

En el valle de México los casos reportados por delegaciones del IMSS, se muestran en la tabla IV.

TABLA IV

Delegación	1	2	3	4	5	6
Nº de casos	15971	12748	15007	21992	14330	6537

Con estos datos nos podemos dar cuenta que la amibiasis es un padecimiento que se produce durante todo el año, pero con una mayor incidencia en los meses más cálidos en zonas calurosas y en entidades de más bajos niveles socioeconómicos y culturales, así como en zonas de poca higiene.

En estudios recientes se ha demostrado que cepas de E. histolytica pueden ser diferenciadas desde un punto de vista enzimático, ya que algunas enzimas, en gel de almidón presentan variación en su patrón electroforético y estas diferencias se encuentran en relación con su patogenicidad, correspondiendo el grupo II a una amiba invasora.

La clasificación de protozoarios se basa en el corrimiento electroforético de tres enzimas: la E.C.2.7.1.1. hexocinasa (HK), la E.C.5.3.1.9. fosfoglucoisomerasa (PGI), y la E.C.2.7.5.1. fosfoglucomutasa (PGM); sobre gel de almidón, de acuerdo a la técnica de Wraxall y Culliford (67).

Sargeant (55,56), al estudiar un gran número de cepas de Entamoeba histolytica las separó en cuatro grupos de acuerdo a su patrón isoenzimático que presentaron, donde una correlación clínica entre el patrón encontrado y la historia clínica del paciente, demostraron que los pacientes con sintomato-

logía de amibiasis correspondieron al grupo II y los pacientes sin sintomatología a los grupos I, III y IV.

2.2. Actividad enzimática de la Entamoeba histolytica.

Se tiene información de estudios enzimáticos llevados a cabo en trofozoítos, cultivados tanto en medios mixtos como monoaxénicos, de la relación que las enzimas estudiadas pueden tener con la clasificación de las cepas o con el carácter invasor del protozoario (42,43), estos estudios se han hecho, no sólo con amibas consideradas patógenas, sino también con algunas no patógenas.

En los trabajos realizados por Chang (7) con Naegleria gruberi se demuestra la existencia de un efecto citopático de esta amiba, al parecer este efecto está en relación a una sustancia capaz de causar un efecto citolítico. Esta actividad citolítica ya había sido observada en Entamoeba histolytica.

Jarumilinta y Kradolfer (24) describen un efecto lítico en los trofozoítos procedentes de cultivos mixtos, sobre leucocitos "in vitro". Eaton (17) a su vez, con trofozoítos de E. histolytica cultivados axénicamente (14), demostró el efecto citolítico sobre células procedentes de mamíferos, esto lo relacionó con el contenido enzimático de los lisosomas de superficie de la amiba, que el parásito usa como agente de agresión.

En estudios realizados, por diversos autores, en trofozoítos, tanto en medios mixtos como monoaxénicos, se encontró gran versatilidad enzimática (34,35). Ahora se ha continuado este tipo de investigación, con trofozoítos cultivados axéni-

camente (14), lo que ha permitido estudiar por primera vez el metabolismo de este protozooario libre de toda contaminación.

Lee y colaboradores (36) trabajando con extractos de la amiba cepa HK-9 hicieron determinaciones enzimáticas encontrando la actividad de aldolasa, deshidrogenasa láctica, arginasa, deshidrogenasa glutámica, transaminasa glutamicoxalacética, ribonucleasa, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida; donde las más importantes son: la aldolasa, esta enzima es considerada como el marcapaso de las reacciones enzimáticas de la vía glucolítica; deshidrogenasa láctica, indicando la ausencia de oxígeno en los procesos de metabolismo de los carbohidratos; arginasa, enzima muy importante en el metabolismo de los aminoácidos; transaminasa glutamicoxalacética, ésta es el enlace de la vía glucolítica y el metabolismo nitrogenado; ribonucleasa, enzima directamente relacionada con la síntesis de proteínas; y la fosfatasa ácida, ésta es de mucho interés ya que se ha relacionado con la acción lítica de la amiba.

2.3. Planteamiento del problema.

Como ya se sabe, la adición de bases púricas o pirimídicas durante el cultivo de microorganismos produce una mutación química, como ejemplo tenemos a la 6-mercapto purina y un agente físico como la luz ultravioleta (63), que también es capaz de producir el mismo efecto, estos agentes provocan una modificación en los ácidos nucleicos y consecuentemente una alteración en la síntesis protéica, con esto podemos predecir que se puede modificar alguna proteína que estuviera en relación con la patogenicidad de la amiba.

Se sabe que en la cepa HK-9, la cual fue aislada de un enfermo con sintomatología de amibiasis invasora, la virulencia es modificada, ya que actualmente no tiene la capacidad de fagocitosis. Por otro lado se ha reportado que las diferentes condiciones del medio pueden incrementar la patogenicidad de la cepa (8), y el hacer pasos sucesivos en animales de laboratorio, hace que la patogenicidad de la amiba cambie de una cepa patógena a una no patógena; con esto se dice que hay diferencias de virulencia en las amibas de poblaciones que tienen una diferente alimentación (6,33,39,53).

Lo anterior dio la posibilidad de poder cambiar el patrón electroforético de las amibas, mediante un compuesto obtenido del Zanthoxylum liebmaniarum (Colopahtle) (51) usado en la sierra de Puebla como agente amebicida, y posterior al tratamiento con éste obtener una modificación en su patrón isoenzimático y lograr cambiar su patogenicidad y que ésta no revierta (15,40).

2.4. Objetivos:

1) Analizar los patrones isoenzimáticos de la Entamoeba histolytica, por el método de Wraxall y Culliford (67), -- después de cultivarla en presencia de "Colopahtle" a diferentes dosis y a diferentes tiempos de incubación.

2) Ubicar a la Entamoeba histolytica, desde un punto -- de vista enzimático, dentro de un zimodemo determinado por -- Sargeaunt, después de que ha sido tratada y cultivada con -- Zanthoxylum liebmaniarum.

2.5. Hipótesis de trabajo.

Se sabe que el patrón isoenzimático de la Entamoeba -- histolytica, puede ser modificado mediante el uso de mutáge-- nos, la adición del compuesto amebicida Zanthoxylum liebma-- niarum (Colopahtle), podría tener alguna actividad mutagénica y modificar el patrón electroforético isoenzimático y con es-- to su grado de patogenicidad.

CAPITULO III

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipo:

Autoclave cilíndrico Barnstead modelo 132.

Balanza analítica Bosch modelo 1225.

Cámara de enfriamiento.

Centrífuga clínica LKB 3021.

Celdas de electroforesis diseño Sargeant.

Fuente de poder LKB 2103 Power Supply.

Incubadora Medi-Lab.

Mechero Tirril ajustable.

Potenciómetro Corning modelo 5.

Refrigerador RCA Whilpoo.

Reloj marcador General Electric.

Termómetro de laboratorio de 10° a 110° C.

Microscopio óptico LKB modelo 1034.

3.2. Material de vidrio:

Aplicadores de madera.

Canastilla para tubos de ensayo.

Cinta testigo de esterilización N° 117.

Cubreobjetos N° 224 X 50 loz. Proper.

Espátula de acero inoxidable.

Frascos ámbar, cap. 100, 500 y 1000 ml.

Frascos de vidrio con tapón de rosca 150 ml.

Gradillas para tubos de ensayo.

Lápiz marcador resistente al calor.

Manguera de hule.

Matraces aforados con tapón, cap. 500 y 1000 ml.

Matraces erlenmeyer graduados, cap. 100, 250 y 500 ml.

Matraz Kitasato Pirex, cap. 250 ml.

Papel glassine para pesar.

Papel milimétrico.

Papel parafilm "M" American Company.

Perillas para pipeta.

Pipetas graduadas, cap. 1, 2, 5 y 10 ml.

Pipetas Pasteur.

Pipetas serológicas desechables de 1.0 ml.

Portaobjetos para microscopio, 75 X 25 mm.

Probetas graduadas, escala 50, 100 y 500 ml.

Tapones de hule N° 00, 0, 6, 7, 8, 9 y 10.

Triplé con tela de asbesto.

Tubos de ensayo 13 X 100 y 16 X 100 mm.

3.3. Material Biológico:

3.3.1. E. histolytica cepa HM-1 IMSS.

En el presente trabajo se utilizó exclusivamente una cepa de Entamoeba histolytica invasora como es la cepa HM-1 IMSS, proporcionada por la Srita. de la Torre -- del Centro Médico Nacional (IMSS).

3.4. Métodos:

3.4.1. Cultivo axénico de Entamoeba histolytica.

Para el cultivo axénico de E. histolytica se utiliza el medio de cultivo TYI-S-33, el cual está constituido de los siguientes compuestos:

Tripticasa	2.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Glucosa	1.0 g
Cloruro de sodio	0.200 g
Fosfato monobásico de potasio	0.050 g
Fosfato dibásico de potasio	0.100 g
Acido L-ascórbico	0.020 g
Clorhidrato de L-cisteína monohidratada	0.100 g
Citrato de amonio férrico	0.228 g
Llevar con agua destilada a:	87.0 g

Procedimiento:

Se disuelven los reactivos en el orden presentado con aproximadamente 50 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 con NaOH 0.1 M. después se llevan a un volumen de 87 ml con agua destilada. El medio TY se clarifica mediante filtración a través de filtro Whatman # 1 y se esteriliza en autoclave a 121°C.

Debido a la gran cantidad de trofozoítos que se necesitan, se prepararon 870 ml de caldo, que corresponden a diez partes del medio TYI-S-33, y enseguida se de-

positaron en matraces erlenmeyer de 125 ml, 87 ml para cada matraz. Este paso se hace en condiciones estériles con ayuda del flujo laminar VECO y un mechero.

El caldo se deja en incubadora a 37°C durante 24 horas y no debe haber desarrollo de microorganismos.

Solución de vitaminas y Tween 80.

A) Solución vitamínica Diamond TPS-1-40X.*

B) Vitamina B₁₂.- Se pesan 40 mg de vitamina B₁₂ y se disuelven en 100 ml de agua destilada, esta solución se pone en frasco ámbar a 4°C.

C) Acido tióctico a 1 mg/ml.- Se pesan 100 mg de ácido tióctico y se disuelven con 100 ml de alcohol absoluto.

D) Tween 80 al 50%. - Se pesan 50 g de tween 80 y se disuelven con 10 ml de alcohol absoluto y se llevan a 100 ml con agua destilada.

*CASA BIOFLUIDOS INC. E.U.A.

Procedimiento:

A 100 ml de la solución (A), se añaden 12 ml de solución (B), 40 ml de la solución (C), 4 ml de la solución (D) y 180 ml de agua destilada. Esta solución se esteriliza mediante un filtro Milipore, con una membrana de 0.2 mm y se coloca en frasco ámbar, se almacena a 4°C.

Para cada 87 ml de caldo TY, se añaden, en condiciones estériles, 3 ml de mezcla vitamínica Tween 80, - para formar el medio TYI-S-33.

3.4.2. Pruebas de esterilidad.

Las pruebas se llevan a cabo para determinar la existencia de una posible contaminación con bacterias y son las siguientes: en la primera se incuba el medio - - TYI-S-33 durante 24 horas a 37°C, habiendo transcurrido éstas se procedió a inocular el medio TYI-S-33 a medios enriquecidos para microorganismos aerobios y anaerobios, con la ayuda de una asa bacteriológica. Estos medios se incubaron 24 y 48 horas a 37°C. En estas pruebas no se debe presentar desarrollo de microorganismos.

3.4.3. Inoculación de trofozoítos al medio de cultivo.

La cepa de E. histolytica que se cultivó en el laboratorio, como ya se mencionó, fue la cepa HM-1. Se usaron tubos de ensaye de 15 X 125 mm con tapón de rosca; por lo general cada tubo con cultivo contenía aproximadamente, 1×10^6 trofozoítos por cada 10 ml de medio. Cada tubo se utilizó para inocular un matraz; éstos se colocan en baño de hielo durante 5 min. para desprender las células de las paredes y así poder inocular los matraces de 125 ml, los cuales contienen 87 ml del medio TYI-S-33, y posteriormente se incubaron a 37°C durante 72 horas.

La recolección, el lavado y la determinación de la viabilidad de los trofozoítos se hizo mediante la técnica de exclusión con azul tripano, que se menciona en el punto 3.4.5.

3.4.4. Cálculo del número total de trofozoítos.

Los trofozoítos se ajustaron a una concentración de 2×10^8 células/ml; el número de células se contó en una cámara de Neubauer y utilizando una pipeta para conteo de glóbulos blancos y se hicieron los siguientes cálculos:

$$\frac{a \times b \times c}{d} \times e =$$

- a. Suma de los cuatro cuadros grandes de la cámara de -- Neubauer.
- b. Dilución 1:10
- c. Factor para determinar el valor por mm^3 (10).
- d. Número de cuadros (4).
- e. Factor para determinar el valor por ml (1000).

Ejemplo:

$$\frac{(a) (20) (10)}{4} (1000) = (a) 50\ 000 \text{ Cél./ml}$$

3.4.5. Recolección, lavado y determinación de la viabilidad de los trofozoítos.

Después de obtener un buen desarrollo de células a las 48 horas, los matraces se colocaron en baño de hielo para ayudar al desprendimiento de células y se ponen en tubos de centrifuga con tapón de rosca, se centrifugaron a 500 X g lavándose con solución salina de fosfatos de un pH de 7.0. Cada procedimiento se hizo durante siete veces con un volumen total de 87 ml.

Al término del lavado de células se comprueba la viabilidad de éstas, colocando una pequeña cantidad de amibas en un portaobjetos a las cuales se les agrega una gota de azul tripano al 0.2%, en solución isotónica. Si las amibas se tiñen fuertemente son células muertas y si no se tiñen están vivas; con esta prueba se determinó -- que los matraces contenían un 97% de amibas vivas.

3.5. Investigación de los cambios en el patrón electroforético isoenzimático de E. histolytica con Colopahtle.

3.5.1. Utilizando diferentes concentraciones en dosis -- única de Colopahtle.

Para la investigación de los patrones electroforéticos isoenzimáticos de la Entamoeba histolytica con dosis única, de diferentes concentraciones, se siguió el siguiente cuadro de incubación, haciendo una determinación de zimodemos donde se indica.

TIEMPO DE INCUBACION	DOSIS DE COLOPAHTLE EN 300 000 AMIBAS				ELECTRO-FORESIS
	1 mg/ml	2.5 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	
48 Hrs.					SI
	1° GENERACION				
48 Hrs.	CULTIVO SOLO SE RECAMBIA EL MEDIO				
	2° GENERACION				
48 Hrs.	CULTIVO SOLO SE RECAMBIA EL MEDIO				
	3° GENERACION				
48 Hrs.	CULTIVO SOLO SE RECAMBIA EL MEDIO				SI

CUADRO DE INCUBACION EN DOSIS UNICA

3.5.2. Utilizando diferentes concentraciones en dosis re
petitivas de Colppahtle.

Para la investigación de los patrones electroforéticos isoenzimáticos de la Entamoeba histolytica con dosis repetitiva, de diferentes concentraciones, se siguió el siguiente cuadro de incubación, haciendo una determinación de zimodemos donde se indica.

TIEMPO DE INCUBACION	DOSIS DE COLOPAHTLE EN 300 000 AMIBAS				ELECTRO-FORESIS
	1 mg/ml	2.5 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	
48 Hrs.					SI
1° GENERACION					
48 Hrs.	CULTIVO SOLO SE RECAMBIA EL MEDIO				
2° GENERACION					
48 Hrs.	CULTIVO SOLO SE RECAMBIA EL MEDIO				
3° GENERACION					
48 Hrs.	CULTIVO SOLO SE RECAMBIA EL MEDIO				SI
48 Hrs.	2° DOSIS				SI
1° GENERACION					
48 Hrs.	CULTIVO SOLO SE RECAMBIA EL MEDIO				
2° GENERACION					
48 Hrs.	CULTIVO SOLO SE RECAMBIA EL MEDIO				
3° GENERACION					
48 Hrs.	CULTIVO SOLO SE RECAMBIA EL MEDIO				SI
48 Hrs.	3° DOSIS				SI
1° GENERACION					
48 Hrs.	CULTIVO SOLO SE RECAMBIA EL MEDIO				
2° GENERACION					
48 Hrs.	CULTIVO SOLO SE RECAMBIA EL MEDIO				
3° GENERACION					
48 Hrs.	CULTIVO SOLO SE RECAMBIA EL MEDIO				SI

CUADRO DE INCUBACION EN DOSIS REPETITIVAS

3.5.3. Determinaciones enzimáticas.

3.5.3.1. Preparación de los lisados.

El matraz con amibas se introdujo 5 min. - en hielo, para despegarlas de las paredes y se colocaron en tubos de plástico de forma cónica, éstos se centrifugan a 350 X g durante 15 min. Se descartó el sobre nadante y se le adicionó una -- mezcla de estabilizadores enzimáticos constituida por EDTA, ácido caprónico y diticeritritol a 0.001 M. Se homogenizó y se dejó en el congelador du--rante 24 horas, después de este tiempo se centri--fugó a 3000 X g durante 30 min. y el sobrenadante se utilizó para llevar a cabo las determinaciones enzimáticas.

Para la conservación de la actividad enzi--mática de las muestras, el sobrenadante se almacenó en alícuotas de 0.1 ml dentro de nitrógeno lí--quido (- 196°C).

3.5.3.2. Determinación de H K.

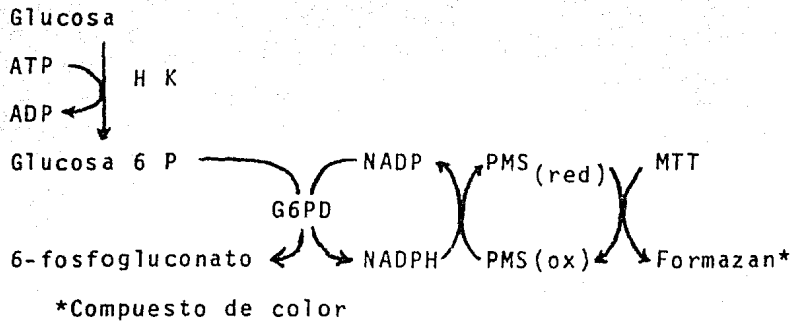
Se preparó un amortiguador de tris, malato, EDTA y $MgCl_2$ a un pH de 7.4 de la siguiente manera: 12.14 g de tris, 11.61 g de ácido málico, - - 2.03 g de $MgCl_2$, 3.72 g de EDTA y 12.8 ml de NaOH 10 N. llevándose el volumen a 1000 ml con agua -- destilada. Se prepara de la siguiente manera: se disuelve el tris, el ácido málico y el $MgCl_2$ primero, se mezclan después el EDTA y el NaOH, se le ajusta el pH para después llevarse a 1000 ml.

El gel de almidón se preparó con el amortiguador tris a una concentración de 0.01 M. a un pH de 7.4.

La electroforesis fue horizontal y se utilizaron celdas con un serpentín, el cual se conecta a una cámara de enfriamiento, para mantener -- las placas a una temperatura constante de 8°C, se corren durante tres horas a una intensidad constante de 75 mA y un voltaje variable de 120 V por caja (placa).

La reacción que se propone, después de llevar a cabo el recorrimiento electroforético para detectar las bandas de esta enzima, se observa en la figura 4.

FIGURA 4



Para el desarrollo de la reacción enzimática se utilizó la siguiente mezcla de incubación.

Tris: Clorhídrico 0.3 M. pH 8.0	7.0 ml
Cloruro de magnesio 1 M.	0.2 ml
NADP (10 mg/ml)	0.5 ml
Dextrosa (40 mg/ml)	1.0 ml
ATP (15 mg/ml)	1.0 ml
G6PD (100 UI/ml)	0.5 ml
PMS (1 mg/ml)	1.0 ml
MTT (5 mg/ml)	1.0 ml
Agar al 1.2%	10.0 ml

3.5.3.3. Determinación de P G I,

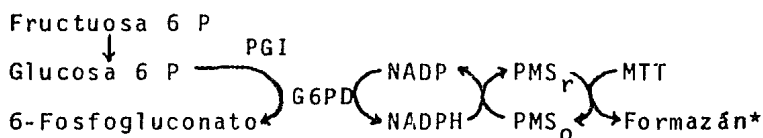
Para la determinación de esta enzima se -- preparó una solución amortiguadora de fosfatos -- 0.2 M. pH 7.0, de la siguiente manera: se pasaron 17.14 g de Na_2HPO_4 anhidro y 12.15 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se ajustó el pH y se llevó a un litro con -- agua destilada.

El gel de almidón se preparó utilizando al midón hidrolizado de acuerdo a las recomendacio-- nes de la casa comercial y se diluyó con amorti-- guador de fosfatos 0.015 M. pH 7.0, se calentó a ebullición, se desgasificó al vacío para poste-- riormente colocarse en láminas de vidrio de 23 X- 15 cm.

La electroforesis se llevó a cabo bajo las mismas condiciones ya descritas en el punto ante-- rior.

La reacción de la figura 5 es la que se -- propone, para encontrar las bandas de esta enzima, después del corrimiento electroforético.

FIGURA 5



*Compuesto de color.

Para el desarrollo de la reacción enzimática se utilizó la mezcla de incubación siguiente:

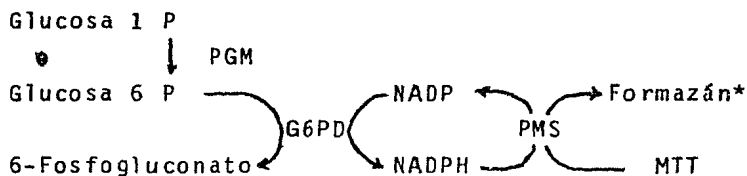
Tris: Cl 0.3 M. pH 8.0	7.0 ml
MgCl ₂ 1.0 M.	0.2 ml
NADEP (10 mg/ml)	0.5 ml
F6P (10 mg/ml)	0.2 ml
G6PD (100 IU/ml)	0.5 ml
PMS (1 mg/ml)	1.0 ml
MTT (5 mg/ml)	1.0 ml
Agar 1.2%	10.0 ml

3.5.3.4. Determinación de P G M.

Para la determinación de esta enzima, las condiciones de la electroforesis, la forma de preparar el gel de almidón y el amortiguador, son -- las mismas que para la enzima descrita en el punto 3.5.3.2.

La reacción que se propone para la visualización de las bandas de esta enzima, es la de la figura 6.

FIGURA 6



*Compuesto colorido.

Los reactivos de coloración son los siguientes:

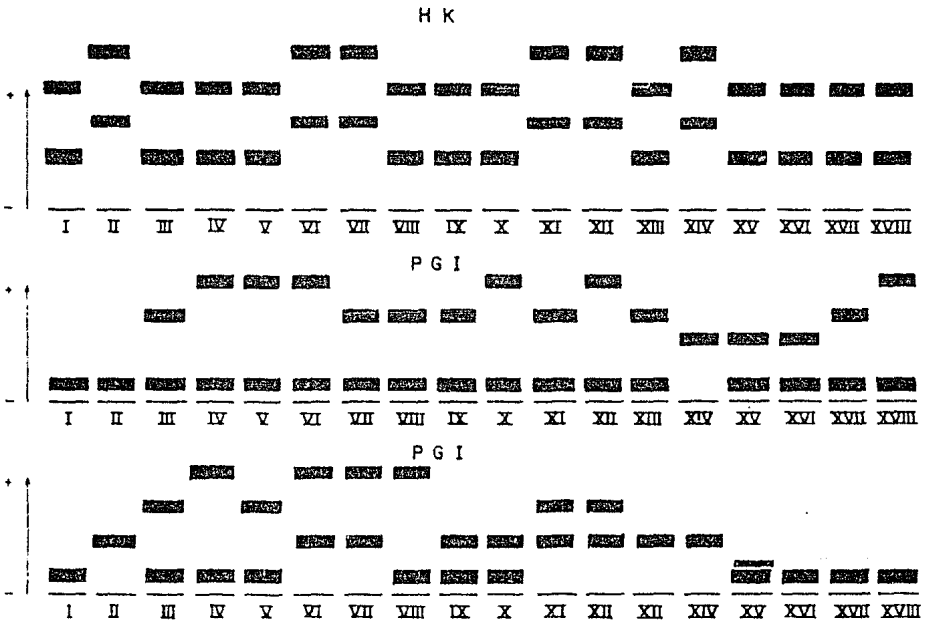
Tris: Cl 0.3 M. pH 8.0	7.0 ml
MgCl ₂ 1.0 M.	0.2 ml
NADP (10 mg/ml)	0.5 ml
G1P (12.5 mg/ml)	0.2 ml
G6PD (100 UI/ml)	0.1 ml
PMS (1 mg/ml)	1.0 ml
MTT (1 mg/ml)	1.0 ml
Agar 1.2 %	10.0 ml

C A P I T U L O I V

RESULTADOS

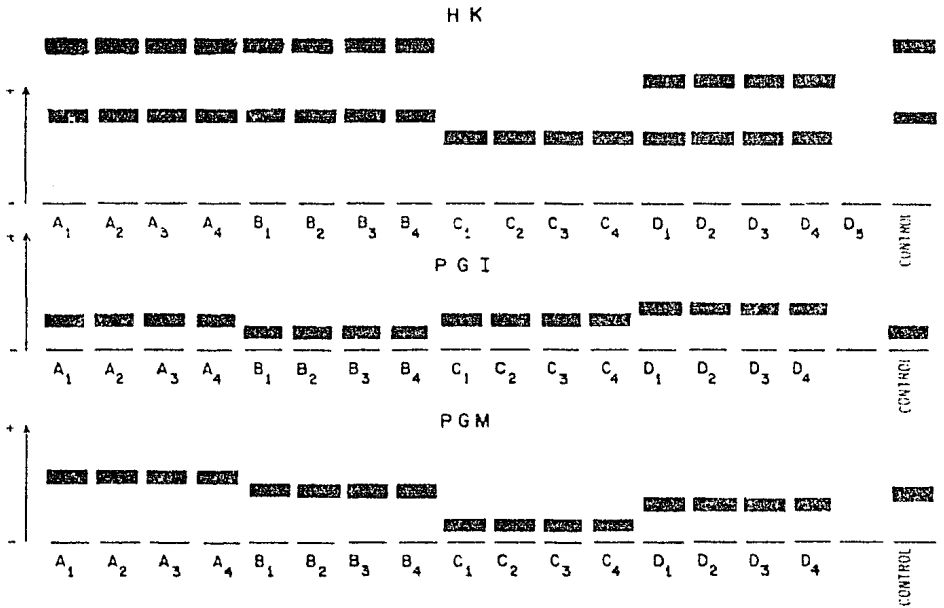
Los patrones electroforéticos isoenzimáticos presentados por las tres enzimas, la E.C.2.7.1.1. hexocinasa, la E.C. 5.3.1.9. fosfoglucoisomerasa y la E.C.2.7.5.1. fosfoglucomutasa: son representados en la figura 7, en la cual podemos observar los dieciocho zimodemos de la Entamoeba histolytica.

FIG. 7 ZIMODEMOS DE ENTAMOEBA HISTOLYTICA



La representación esquemática de la posición de las --
bandas, que da la cepa HM-1 IMSS, después de 48 horas de cul-
tivo con una sola dosis y a diferentes concentraciones de Co-
lopahtle, después del corrimiento electroforético en gel de -
almidón, se muestran en la figura 8.

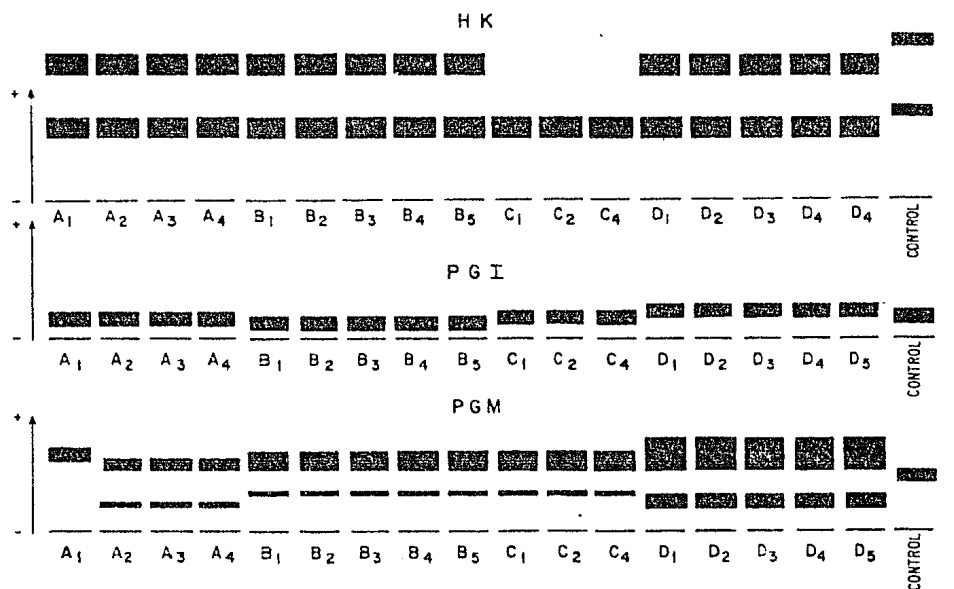
FIG.8-CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE AMIBAS CULTIVADAS DURANTE 48 HRS
CON UNA DOSIS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COLOPAHTLE



A _{1, 2, 3, 4}	1 mg./ml.	DE EXTRACTOS DE ZANTHOXYLIUM LIEBMANIARUM (COLOPAHTLE)
B _{1, 2, 3, 4}	2.5 mg./ml.	" " " "
C _{1, 2, 3, 4}	5 mg./ml.	" " " "
D _{1, 2, 3, 4}	10 mg./ml.	" " " "

Los resultados a las 48 horas de cultivo de la tercera generación, cuando se utilizó una dosis única a diferentes -- concentraciones de Colopahtle y después del corrimiento electroforético, se muestran en la figura 9.

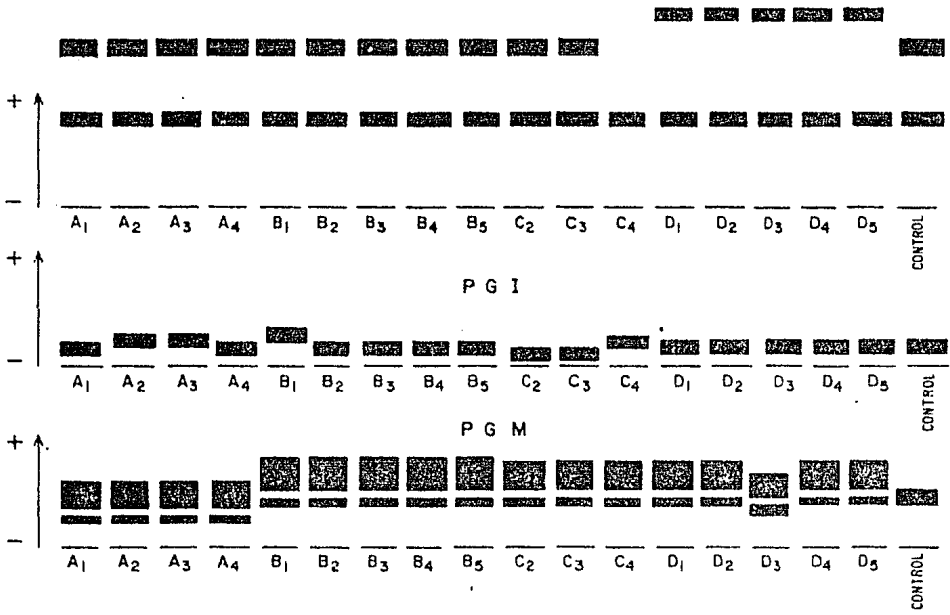
FIG.9 -CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE AMIBAS CULTIVADAS DURANTE 48 HRS DE LA TERCERA GENERACION CON UNA SOLA DOSIS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COLOPHATIE .



A 1, 2, 3, 4	1	mg/ml.	DE EXTRACTOS DE ZANTHOXYLIUM LIEBMANIARUM (COLOPAHTLE)
B 1, 2, 3, 4, 5	2.5	mg/ml.	" " " "
C 1, 2, 4	5	mg/ml.	" " " "
D 1, 2, 3, 4, 5	10	mg/ml.	" " " "

Los resultados de cultivar *E. histolytica* con una segunda dosis a diferentes concentraciones de Colopahtle y después de 48 horas de cultivo se muestran en la figura 10.

FIG.10 CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE AMIBAS CULTIVADAS DURANTE 48 HRS. CON UNA SEGUNDA DOSIS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COLOPAHTLE



A _{1, 2, 3, 4,}	1	mg / ml.	DE EXTRACTOS DE ZANTHOXYLIUM LIEBMANIARUM (COLOPAHTLE)
B _{1, 2, 3, 4, 5}	2.5	mg / ml.	" "
C _{2, 3, 4,}	5	mg / ml.	" "
D _{1, 2, 3, 4, 5}	10	mg / ml.	" "

Las demás dosis repetitivas, que se muestran en el cuadro de la página 38, no se pudieron hacer ya que la Entamoeba histolytica tuvo muy poco crecimiento, no lográndose tener -- una cantidad adecuada de trofozoítos, por lo tanto no hubo la cantidad suficiente de lisados para el corrimiento electroforético.

Se observó que en la primera generación, de la tercera dosis, el número de trofozoítos disminuyó y éstos se redondearon. Con el siguiente subcultivo las amibas se vacuolizan y se revientan, ya para la tercera generación no hay crecimiento amibiano.

CAPÍTULO V

RESUMEN DE RESULTADOS

1.- Se cultivó Entamoeba histolytica, en forma axénica, de la cepa HM-1 adicionando 1, 2.5, 5 y 10 mg/ml de extractos de Zanthoxylum liebmaniarum (Colopahtle).

2.- Se determinó el patrón electroforético isoenzimático después de 48 horas de cultivo, de la H K, P G I, y P G M.

3.- Después de recibir la primera dosis, las amibas -- fueron subcultivadas durante tres generaciones y nuevamente -- se les determinó su patrón electroforético.

4.- La H K mostró en la concentración de 5 mg/ml, para la primera dosis, la pérdida del carácter isoenzimático y después de ser subcultivadas durante tres generaciones continuó con esta alteración.

5.- Las amibas desarrolladas en una primera dosis de -- cuatro diferentes concentraciones de Colopahtle y después de -- tres generaciones de cultivo, produjeron cambios en el corrimiento electroforético de la P G I con respecto al control, -- éstos fueron mínimos en ambos casos.

6.- La P G M, en las condiciones antes mencionadas, -- presentó pequeñas modificaciones después de 48 horas de cultivo, solamente a concentraciones de 1, 5 y 10 mg/ml, sin embargo cuando las amibas se cultivaron durante tres generaciones -- los cambios en el patrón electroforético fueron muy importantes.

7.- Las amibas expuestas a una segunda dosis de Colopahtle en las concentraciones ya mencionadas y cultivadas durante tres generaciones, también presentaron alteraciones en el patrón electroforético.

8.- En la H K se observaron modificaciones relacionadas con la distancia en el corrimiento electroforético, sin perder el carácter de isoenzima, sin embargo, después de ser cultivadas durante tres generaciones, el carácter isoenzimático se perdió en dos clonas cultivadas a concentraciones de 5 y 10 mg/ml de extractos de Colopahtle.

9.- Nuevamente la enzima P G I presentó cambios poco importantes, en amibas cultivadas con una segunda dosis de Colopahtle y después de tres generaciones de crecimiento.

10.- Con respecto a la P G M las amibas cultivadas en presencia de una segunda dosis desarrolló cambios muy importantes, los cuales se hicieron más visibles en la tercera generación de cultivo.

11.- En una tercera dosis de Colopahtle el crecimiento celular fue muy bajo y no fue posible realizar las determinaciones enzimáticas.

C O N C L U S I O N E S

CONCLUSIONES

Los estudios enzimáticos de Entamoeba histolytica, tratando de mostrar la diferente patogenicidad de ésta frente al huésped, fueron llevados inicialmente por Dobell (16) quien demostró diferencias cuantitativas de hidrolasas en amibas obtenidas de pacientes asintomáticos y en amibas invasoras.

Los estudios de Sargeant y Jiménez (59), correlacionaron el patrón electroforético isoenzimático con patogenicidad y en base a sus hallazgos sugirieron que este carácter está en estrecho enlace con su actividad metabólica.

De acuerdo a nuestros resultados presentados en la figura 8 pudimos observar que la H K a las dosis A y B, correspondientes a 1 y 2.5 mg/ml respectivamente, no hay modificación, sin embargo en la dosis C de 5 mg/ml en lugar de presentar el carácter isoenzimático, éste se pierde; así como la banda presenta un corrimiento electroforético lento y en la dosis de 10 mg/ml se muestra una doble banda también con un corrimiento lento.

Al estudiar la P G I pudimos advertir que las concentraciones de 1 y 5 mg/ml afectaron a esta enzima, modificando su patrón electroforético con una ligera migración más rápida que el mostrado por el control. En relación a la dosis de 2.5 mg/ml no se presentó ninguna alteración y en la dosis correspondiente a 10 mg/ml, este corrimiento fue todavía más rápido.

Con respecto al corrimiento electroforético desarrollado por la P G M se hicieron notar las alteraciones a concentraciones de 1, 5 y 10 mg/ml por lo que inferimos que hubo cambios en el peso molecular ya que los corrimientos fueron diferentes con respecto al control y cuando se utilizó la concentración de 2.5 mg/ml ésta no mostró ninguna modificación referente a su corrimiento electroforético.

Los trabajos de Tiburcio (63) utilizando la 6-mercaptopurina, adicionada a los cultivos de amibas, mostró que el uso de un nanogramo produce alteraciones en el corrimiento electroforético, siendo éstos sumarios, sin embargo en nuestro caso este fenómeno no se presentó por lo que sugerimos que las alteraciones metabólicas son diferentes.

El estudio enzimático de las amibas cultivadas hasta su tercera generación fueron realizados con el objeto de investigar si la alteración producida inicialmente, en los cultivos de 48 horas permanecía o se modificaba.

La figura 9 mostró que la H K en la dosis de 5 mg/ml las alteraciones resultantes fueron más severas, ya que desapareció el carácter isoenzimático, y por lo contrario, en las amibas cultivadas a las concentraciones restantes, el corrimiento fue solamente más lento, esto nos indicó que el daño producido fue de menor importancia.

En relación a la P G I estudiada en estas amibas, logramos observar cambios mínimos a todas las concentraciones,-

en donde se presentaron pequeños desplazamientos y más intensamente a una concentración de 10 mg/ml.

Por el contrario, al estudiar a la P G M, ésta presentó variaciones electroforéticas muy importantes a todas las concentraciones, mostrando un carácter isoenzimático que en el control no se presentó. Cabe mencionar que esta enzima -- nos hace una clara diferencia entre una amiba patógena de la que no lo es, de acuerdo a lo establecido por Sargeant (56, 57) por lo que pudimos inferir en una modificación en la patogenicidad de esta cepa, cultivada en presencia de Zanthoxy- lium liebmaniarum (Colopahtle), así como sucedió en el trabajo experimental realizado por Tiburcio (63).

Para determinar si la alteración producida por la acción del Colopahtle podía ser modificada o permanecía constante se usaron dosis repetitivas, esto es, que después de recibir la primera dosis y cultivarla durante 48 horas se adicionó, a los cultivos, una segunda dosis para seguir subcultivándola durante tres generaciones, cada una de 48 horas.

Los resultados obtenidos para la H K, en la figura 10, se muestra que en las primeras dosis de 1 y 2.5 mg/ml no se presentó ninguna alteración, sin embargo, a una dosis de 5 mg/ml, en una de las clonas observadas, el carácter no isoenzimático permaneció, a diferencia del control, no obstante que en dos de ellas se recuperó. Con respecto a la dosis de 10 mg/ml las bandas tuvieron una separación mucho más importante, haciéndose pensar, nuevamente, en la pérdida de peso molecu--

lar en una de las isoenzimas.

El estudio de la P G I mostró, repetidamente, pequeñas modificaciones en su corrimiento electroforético, por lo que intuimos que esta enzima es poco modificada en las condiciones de cultivo de las amibas.

Por lo contrario, en la P G M, se obtuvieron alteraciones muy marcadas, por la presencia del carácter de isoenzima, no presentado por el control. Dio la impresión que la alteración producida, después que las amibas fueron cultivadas durante 48 horas, se incrementó en relación a cuando éstas se cultivaron durante tres generaciones, el daño producido se hizo más patente.

El análisis electroforético de las amibas subcultivadas después de la tercera generación con una segunda dosis, - mostrado en la figura 11, para la H K nuevamente presentó pocas modificaciones a dosis de 1, 2.5 y 5 mg/ml, y solamente una clona de la última dosis presentó la pérdida del carácter isoenzimático y a dosis de 10 mg/ml aunque se conservó el carácter de isoenzima, el patrón fue diferente al encontrado en el control.

La P G I presentó pocas modificaciones en todas las -- concentraciones utilizadas, por lo cual inferimos que el Colo pahtle no tiene ninguna acción sobre ella.

En relación a la P G M las alteraciones observadas en el patrón electroforético se hicieron muy visibles, ya que se

presentó desde pérdida del carácter isoenzimático, que se había modificado en la primera dosis, hasta presencia de éste, pero diferente del control, por lo que pensamos, que la alteración metabólica producida, por una segunda dosis y después de la tercera generación, fue mayor.

Las amibas fueron cultivadas con una tercera dosis, pero el número y la viabilidad disminuyó en forma muy importante, por lo que no fue posible llevar a cabo el corrimiento -- electroforético isoenzimático.

Pensamos que este estudio tiene importancia, desde el punto de vista genético y bioquímico, ya que fue posible modificar el patrón electroforético de dos enzimas, la H K y la P G M en forma definitiva, porque este cambio se mantuvo después de cultivar a las amibas durante tres generaciones, modificando, probablemente, la actividad metabólica que originalmente tenía, considerando que estas dos enzimas intervienen en una de las vías más importantes para ellas, como es la glicolítica (34,35).

Por otro lado este producto pudiera ser empleado en la terapéutica de la amibiasis, ya que al producir una alteración metabólica enzimática en la amiba, la lleva en forma gradual a la muerte, esta pudiera ser otra alternativa de tratamiento de la amibiasis, ya que los productos que actualmente se utilizan indiscriminadamente, son tóxicos.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. ALARCON, D.G., (1943)
El síndrome hepatopulmonar amibiano.
Gac. Med. de México, t. LXXXIII núm. 5
2. BEAVER, P.C., JUNG, R.C.; SHERMAN, H.J.; READ, T.R.
Y ROBINSON, T.A. (1956)
Experimental E. histolytica infection in man.
Am. J. Trop. Med. and Hyg. 5:1000
3. BECERRA, E.; MINVILLE, L.; Y COLORADO, F. (1952)
Consideraciones sobre mil casos de enfermos con amibiasis
intestinal.
Rev. Inves. Clín. 4;193-201
4. BECK, W.C. Y DRBOHLAV, J. (1925)
The cultivation of E. histolytica.
Proc. Nat. Acad. Sci. II:235
5. BRASSETTI, F.
Comparación de los métodos curativos del absceso hepático.
Tesis para obtener el título de medicina y cirugía, Escuela
la Nacional de Medicina, México 1869
6. CARRERA, G.M., E.H. SADUM, E.C. FAUST (1952)
The effect of protein deficient diets on the susceptibi-
lity of ginea pigs to infection whit E. histolytica.
Amer. J. Trop. Med. Hyg.; 1.

7. CHANG, S.L. (1962)
Small free-living amoebae.
Comunicación personal
8. CHAVEZ, A.; M. AURBANEL, I. ITURBIDE, M. SEGURA. (1979)
Cambios en el trofozoito de E. histolytica producidos --
por modificaciones al medio.
Arch. Invest. Med., sup. 1, 219
9. COUNCILMAN, W.T., Y LAFLEUR, H.A. (1891)
Amebic dysentery.
Jhones Hopkins Hosp. Rep., 2:395
10. CRAIG, C.F. Y FAUUST, E.C.
Clinical parasitology.
Ed. Lea and Febiger. 5/o Ed. 1978 p. 25,30.
11. CRAIG, C.F. (1944)
The etiology, diagnosis and tratament of amebiasis.
Williams and Wilknis, Baltimore
12. DESCHIENS, R.
L'Amibiase et l'Amibe disenterique.
Ed. París Masson et Cia. 1965 p. 29-127
13. DIAMOND, L.S. (1960)
The axenic cultivation of two reptilian parasites, Entamoeba terrapinae. Sanders and Cleveland. 1930. and Entamoeba invadens. Rodhain 1934.
Journal of parasitology. 46, 484

14. DIAMOND, L.S. (1969)
Techniques of axenic cultivation of E. histolytica Schaudinn 1903 and E. histolytica-Like amebae.
J. Parasit. 54; 1047
15. DIAMOND, L.S. (1978)
Symposium on the virulence of E. histolytica, Introductory Remarks.
Arch. Invest. Med. 9, sup. 1, 163
16. DOBBEL, C.
The amoebae living in man.
ed. John Bale Sons and Danielson, London 1919
17. EATON, R.; MEEROVITCH, E. Y COSTERTON, J.N. (1969)
A surface-active lysosome in Entamoeba histolytica.
Trans. Roy. Soc. Med. Hyg. 63:678
18. ELSDON-DEW, R. (1968)
The epidemiology of amoebiasis.
Advances in parasitology, 6, 1-62
19. FERNANDEZ DEL CASTILLO F.
Prólogo a la bibliografía Mexicana del absceso hepático.
ed. La Prensa Médica Mexicana. 1956
20. FOURNIER V.R.; REBOLLEDO LARA, M.; TREVIÑO V.A. (1950)
Tratamiento médico del absceso hepático amibiano.
Rev. Med. del Hospital General vol. XIII

21. FURSZYFER M.P., et al.
Un nuevo fármaco antiamebiano (Hemezol) vs metronidazol-
en el tratamiento de pacientes con amebiasis intestinal.
Semana médica de México 1980, p. 109-118
22. HLAVA, J. (1887)
O. Uplavici. Predbezne spelini.
Casopis Leskaruv Ceskych, 26:No 5
23. HOARE, C.A. (1952)
The comensal phase of E. histolytica.
Parasitological reviews. Exp. Parasit. 1:411
24. JARUMILINTA, R. Y KRADOLFER, F. (1964)
The toxic effect of E. histolytica on leucocytes.
Ann. Trop. Med. and Hyg. Parasit. 58:375.
25. JIMENEZ, M.P.
Clínica médica. Lecciones dadas en la escuela de medici-
na de México.
Imprenta Murguía, Portal del Aguila de Oro, México 1856
26. JIMENEZ CARDOSO, E., J. KUMATE (1982)
Correlación clínica de zimodemos de E. histolytica.
Arch. Invest. Med. 13 sup. 3. 77-82
27. KARTULIS, S. (1904)
Gehirna abscesse nach dysenterischen Leberabscessen.
Zentralbl f. bakt., 3:527

28. KARTULIS, S. (1886)
Zur Aetiologie der desinteriae in aegypten.
Virchow's Archiv. f. path. Anat., 105:521
29. KOCH, R. (1883)
Arb. Kaiserl.
Gesundheitsamte, 3:1
30. KUMATE, J.; ARANDA, E.
Enfermedades diarreicas en el niño.
8/o Ed. ed. Med. del Hospital Infantil de México 1983
31. LAMBL, W.D. (1860)
Beobachtungen und studienaus dem Franz-Josep Kinders-
pital.
Teil I.
32. LARIOS, F. (1881)
Absceso hepático amibiano en el estómago.
"La Esc. de Med.", t. III núm. 1, México
33. LARSH, J.E. (1952)
The effect of blaktongus-producing diet on experimental
amoebiasis in dogs.
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1.
34. LEE, E., DE LA TORRE M., PALACIOS O., DEL RIO C. y
LANDA, L. (1967)
Enzimatic activities related to the intermediary metabo-
lism of E. histolytica.
III Congreso internacional de Bioquímica, Tokio.

35. LEE, E., PALACIOS, O., AUBANEL, M. Y LANDA, L. (1970)
Avances en la investigación de la actividad enzimática -
de E. histolytica.
Arch. Invest. Med. Méx. 1:521
36. LEE, E., PALACIOS, O. Y LANDA, L. (1971)
Estudio de la actividad de E. histolytica procedente de-
cultivos axénicos.
Arch. Invest. Med. Méx. 2, sup. 1:173
37. LEWIS, M.J. (1980)
Ann. Rep. San Comm Gov't India.
Calcuta.
38. LÖSCH, F. (1875)
Massenhafte entwicklung von Amöben in Dickdarm.
Virchow's Archiv. f. Path. Anat., 65:196
39. LYNCH, J.E. (1957)
Histological observation on the influence of a special -
diet used in experimental amebiasis in ginea pigs.
Amer. J. Trop. Med. Hyg. 6.
40. MATTERN, C.F.T., D.B. KEISTER, P.C. NATOVITS. (1982)
Virulence of E. histolytica upon continues axenic culti-
vation,
Arch. Invest. Med. 13, sup. 3, 185

41. MENDIZABAL, G. (1914)
El clorhidrato de Emetina.
Gac. Med. de México. t. IX 3/o serie núm. 4
42. MONTALVO, F. Y REEVES, R.E. (1968)
Electroforetic characterization of amoebic glucose-6-phosphate isomerase.
Exp. Parasit. 22:129
43. NEAL, R.A. (1957)
Strain variation in Entamoeba histolytica.
Parasitology 50:532
44. OROZCO, E., G. GUARNERIUS, A. MARTINEZ PALOMO (1982)
Clonas de E. histolytica deficientes en fagocitosis, presentan deficiencia en virulencia.
Arch. Invest. Med. 13, sup. 3:137
45. PHILIPS, B.P. (1950)
Cultivation of E. histolytica with Tripanosoma cruzi.
Scienc. 111:8
46. PRIETO, I. (1896).
Absceso de hígado.
Rev. Quinc. Ant. Patol. y Clínicas Med. y Quirur. t.I,#10
47. PRIETO, I. (1911)
Colecciones supuradas del hígado.
Gac. Med. de México, t. VI 3/o. serie núm. 4

48. PRUNEDA, A. (1906)
Diagnóstico de los abscesos hepáticos.
Rev. Med. t. XVII, núm. 1, México
49. RAMOS, P. Y HARO, P.
Amibiasis hepática. Experiencia de la unidad de Gastroenterología del Hospital General.
Ed. La prensa Médica Mexicana 1956.
50. REEVES, R.E. Y BISCHOFF, J.M. (1968)
Classification of Entamoeba species by means of electrophoretic properties of amebal enzymes.
J. Parast. 54:594
51. REGISTRO DE PLANTAS MEDICINALES. (1982)
Congreso Latinoamericano de Botánica.
Perú, Sep.
52. ROMER, HANS. et al. (1980)
Timidazol en el tratamiento de la amibiasis intestinal - de los niños.
Invest. Med. Inter. 7, 20
53. SADUM, E.M., J.L. BRADIM Jr., E.C. FAUST. (1951)
The effect ascorbic acid deficiency on the resistance of ginea pigs infection whit E. histolytica of human origin.
Amer. J. Trop. Med. Hyg. 31

54. SARGEAUNT, P.G. (1962)
Confirmation of amoebic chromatoids by stain after rid-
leys fecal concentration,
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 56:12-24
55. SARGEAUNT, P.G. AND WILLIAMS, J.E. (1978)
Electrophoretic isoenzyme patterns of E. histolytica and
Entamoeba coli.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 164-166
56. SARGEAUNT, P.G. AND WILLIAMS, J.E. (1978)
The diferentiation of invasive and non invasive E. histo-
lytica by isoenzyme elecypophoresis.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:519-521
57. SARGEAUNT, P.G. AND WILLIAMS, J.E. (1979)
Electrohoretic isoenzyme patterns of the patogenic non -
patogenic intestinal amoebae of man.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 73:225-221
58. SARGEAUNT, P.G., WILLIAMS, J.C. AND NEAL. R.A. (1980)
A comparative study of E. histolytica (NIH:200, HK-9, --
etc.) "E. histolytica-like" and other morphologycaly --
identical amoebae isoenzyme electrophoresis.
Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 469-474
59. SARGEAUNT, P.G.; WILLIAMS; KUMATE, J.; JIMENEZ, E. (1980)
The epidemiology of E. histolytica in Mexico City. A pi-
lot survery I.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 74:653-656.

60. SCHAUDINN, F. (1903)
Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden.
Arb. a. d. k. Gsndhtsmt., 19:547
61. SEPULVEDA, B. Y JUNICH, H. (1950)
Hepatitis y absceso hepático amibiano. Diagnóstico y tratamiento médico.
Rev. Invest. Clín. del Hosp. de Enf. de la Nutr. vol II,
4
62. SILVA, M. (1884)
Ligeras consideraciones acerca de un absceso hepático --
abierto a la pared abdominal.
"La Esc. de Med." t. V, núm. 14, México
63. TIBURCIO-FELGEROSO, R.C.
Cambios mutagénicos de E. histolytica y su relación con alteraciones enzimáticas, inmunológicas y de patogenicidad.
Tesis para obtener el título de Q.F.B., Universidad Motolinía, México 1983.
64. TREVIÑO-GARCIA, M.N.; CASTAÑEDA, M. y GONZALEZ, A. (1973)
Comparación entre los trofozoítos de E. histolytica procedentes de portadores asintomáticos y los obtenidos de pacientes con lesiones amibianas.
Arch. Invest. Med. (Méx.) r. 5 sup. 1:17

65. TRISSL-GARCIA MANZO, M., A. MARTINEZ PALOMO, M. DE LA -
TORRE, R. DE LA HOZ, E. PEREZ DE SUAREZ (1978)
Fagocitosis de eritrocitos humanos por la E. histolytica.
Arch. Invest. Med., 9 sup. 1, 257
66. WILMONT, A.J.
Clinical Amoebiasis.
Ed. Davis, Philadelphia F.A. 1962, p. 11
67. WRAXALL, B.G.D.; CULLIFORD, B.J. (1968)
A thin-layer starch-gel method for enzyme typing of - -
Blood Stain.
J. For. Sci. Soc. 8;8184
68. ZAMORA, J.E.
Breve estudio sobre los abscesos del hígado.
Tesis presentada en la Escuela Nacional de Medicina - -
(Méx.) 1874