

302527

11
25



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

**ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**INVESTIGACION DEL EFECTO CITOLITICO DE
Entamoeba histolytica CEPA HMI-IMSS CULTIVADA
EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE S-ADENOSIL-
L-HOMOCISTEINA**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
SILVIA ANTONIETA PEREZ VELASCO

México, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pag.
CAPITULO I. INTRODUCCION	1
CAPITULO II. ANTECEDENTES	3
CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1.- Diseño Experimental	6
3.2.- Material, Reactivos y Equipo	7
3.2.1.- Material Biológico	7
3.2.2.- Material de Laboratorio	7
3.2.3.- Reactivos	8
3.2.4.- Equipo	9
3.2.5.- Preparación de Reactivos	9
3.2.5.1.- Cultivo Axénico de <u>E. histolytica</u> cepa HMI-IMSS	9
3.2.5.2.- Cultivo de Línea Celular CHO.	11
3.3.- Metodología.	12
3.3.1.- Investigación de la Capacidad de Lisis de <u>E. histolytica</u> en cultivos de células CHO.	12
3.3.2.- Cinética de Lisis de <u>E. histolytica</u> cepa HMI-IMSS cultivadas en presencia de diferentes con- centraciones de S-Adenosil-L- Homocisteína en cultivos de - células CHO.	12

	3.3.3.- Investigación del Efecto Citolítico de <u>E. histolytica</u> cepa HMI-IMSS cultivada en presencia y ausencia de S-Adenosil-L-Homocisteina sobre células CHO, determinada por la liberación de radiactividad y su testigo.	13
	3.4.- Análisis Estadístico	14
CAPITULO	IV.- RESULTADOS Y DISCUSION	
	4.1.- Resultados	15
	4.2.- Discusión	31
CAPITULO	V.- CONCLUSIONES	34
	BIBLIOGRAFIA	35

CAPITULO I

INTRODUCCION

Una de las manifestaciones clínicas de la patogenicidad de E. histolytica se determina por la capacidad de destrucción que ejerce sobre la mucosa del colon al invadir la pared intestinal (1); lo que al parecer mantiene relación directa con el fenómeno de adherencia de la amiba a las células intestinales.

Para iniciar la invasión de los tejidos, los trofozoitos de E. histolytica requieren mucina, este hecho ya ha sido probado en estudios llevados a cabo con células procedentes de ovario de hamster chino (CHD) (18,39 Y 40) . En estos estudios se muestra la participación de dos adhesinas (una sensible a inhibirse con N-acetil-glucosamida y otra constituida por polímeros de N-acetil-galactosamina) en los mecanismos que determinan el daño celular en el huésped y con ello se concluye que este fenómeno es mediado por carbohidratos (26,34,38,41,43).

La adhesión de los trofozoitos a las células blanco parece ser un prerrequisito en el mecanismo de agresión de E. histolytica, pero la adhesión per se no parece ser una determinante de la virulencia de las cepas; algunos estudios han demostrado que puede incrementarse el nivel de virulencia de una cepa "in vitro" cuando se modifican las condiciones del medio de cultivo ya sea con adición de colesterol (13,31) o el incremento en el número de bacterias (57).

Otros estudios señalaron que en la quimiotaxis podría aumentar la virulencia, es un hecho que la metilación de proteínas específicas de membrana son necesarias para la respuesta quimiotáctica en bacterias (36) y en células fagocíticas eucarióticas (51) y que a través de reacciones de transmetilación mediadas por la S-Adenosil- L-metionina en presencia de los formil-péptidos en especial el formil-metionil-

leucil-fenil alanina (análogos sintéticos de productos bacterianos naturales) se aumenta la frecuencia en la emisión de pseudópodos que se lleva a cabo en la fagocitosis (10,49).

Con el objeto de poder observar si estas reacciones de transmetilación favorecen el fenómeno de quimiotáxis y el incremento en frecuencia de producción de pseudópodos en estos parásitos a los medios de cultivo de E. histolytica se les adicionó una enzima que cataliza las principales metilaciones desde el punto de vista biológico, la S-Adenosil-L-Homocisteína (producto intermediario en las síntesis de cisteína). La demostración presente "in vitro" de estos procesos será determinada por la presencia de un efecto citolítico aumentado provocado por este protozooario sobre las líneas de células de ovario de hamster chino (CHO).

CAPITULO II

ANTECEDENTES

Una de las enfermedades parasitarias más comunes en países en desarrollo como México, es la amibiasis, producida por E. histolytica (47) tiene una distribución amplia en todo el mundo; independientemente del clima, pero predomina en comunidades con condiciones sanitarias inadecuadas y bajo nivel socioeconómico (20,55).

E. histolytica pertenece a la Familia: Entamoebidae; Orden: Amoebidae; Subphylum: Sarcodina y por formar pseudópodos lobosos pertenece a la Clase Lobosea (29).

Dentro del Género: Entamoeba, se reconoce dos especies que infectan al hombre E. histolytica y E. hartmanni, esta última se diferencia de la primera por su tamaño, constitución antigénica, no es invasora y el tamaño del trofozoito es mayor en E. histolytica (20).

La identificación del parásito, fue hecha por Lambie en 1860 (28) y Lösch (30) en 1875 reproduciendo las lesiones intestinales en un perro mediante la inoculación de evacuaciones de un hombre con disenteria.

Kartulis (24) estableció la correlación entre Diarrea Tropical y Amibiasis, así como la asociación de abscesos hepáticos amibianos y lesiones intestinales en gatos. Posteriormente en 1891 Councilman y la Fleur (11) señalaron la diferencia entre disenteria amibiana y disenteria disentérica.

La forma móvil o trofozoito vive generalmente en la luz del intestino grueso, donde se multiplica, es muy lábil y se diferencia del quiste, porque esta última, es la forma de resistencia responsable de la transmisión de la enfermedad descrita por Schaudin (45). Si se considera que la amibiasis es

un problema de salud tan importante , no es sorprendente el que se hallan efectuado innumerables estudios, a fin de conocer los mecanismos de virulencia (35) en los que involucran fagocitosis (44), invasión (6), adherencia (43), así como citopatogenicidad (54), pasando a un segundo término la morfología del parásito, pues como se sabe E. histolytica y E. invadens son indistinguibles morfológicamente (9).

La fase del trofozoito fluctúa entre 10 a 60 μ de diámetro con la emisión de pseudópodos de formación rápida entre los cuales se observan diferencias entre el ectoplasma hialino y transparente y el endoplasma con inclusiones (4,29,52). En estudios con microscopía electrónica se observan formaciones esferoidales, estomas de micropinocitosis y macropinocitosis, filópodos, así como uroides (6).

Cuando las condiciones del medio ambiente son poco favorables la amiba empieza a inmovilizarse y elimina el material citoplasmático que no ha sido digerido y se redondea revistiéndose de una doble membrana gruesa y refringente. Lo cual le confiere resistencia al parásito con un sólo núcleo, volviéndose multinucleado para constituir la fase quística (29).

El hecho de que este protozoario se pueda presentar en pacientes sintomáticos como asintomáticos ha despertado el interés por estudiar los mecanismos de virulencia (25). Sin embargo poco se sabe sobre su metabolismo intermediario que induce el inicio de la capacidad invasora de las amibas.

En este trabajo se decidió investigar la acción de la S-Adenosil-L-Homocisteína sobre la virulencia de la cepa HMI-IMSS de E. histolytica en base a los trabajos de Cochane quien demostró los mecanismos de estimulación celular a través de

formil-peptidos, lo cual explica el fenómeno de quimiotaxis en los leucocitos (10).

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- Diseño Experimental.

EFECTO CITOLITICO DE E. histolytica

Cinética de lisis en células de ovario de hamster chino utilizando diferentes concentraciones de trofozoitos cultivados en 4 concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína y sin ella.

Cinética de lisis determinada por la radiactividad liberada de células de ovario de hamster chino utilizando diferentes concentraciones de trofozoitos cultivados en 4 concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína y sin ella.

Cultivo de células de ovario de hamster chino.

Cultivo Axénico de E. histolytica.

Cultivo de células de ovario de hamster chino.

Cultivo Axénico de E. histolytica.

Llevar a confluencia durante 48 horas

Incubar los trofozoitos con 4 concentraciones diferentes de S-Adenosil-L-Homocisteína durante 48 horas

Marcar con III Oxima de Indio.

Incubar los trofozoitos con 4 concentraciones diferentes de S-Adenosil-L-Homocisteína durante 48 horas

Incubar durante 6 hrs a 37°C

Incubar durante 6 hrs a 37°C

Presencia de lisis con criterio morfológico.

Medir radiactividad liberada en contador Gamma Packard.

3.2.- Material, Reactivos y Equipo:

3.2.1.- Material Biológico.

E. histolytica cepa HMI-IMSS.- Cultivo axénico por el método de Diamond (15).

Línea de Células de ovario de hamster chino.- Cultivo en Medio F-10 X (33).

3.2.2.- Material de Laboratorio:

Baño de hielo

Cámara de Neubauer

Cajas Nuncio de 50 ml (plástico)

Embudos de talle largo

Filtro Milipore 0.22 μ m

Frascos ambar de 30 ml

Gradilla para tubos

Matraz Kitazato de 500 ml

Matraz Erlenmeyer Pyrex de 125 y 250 ml

Matraz aforado Pyrex de 500 y 1000 ml

Mechero Bunsen

Membrana Milipore de 0.22 μ m

Papel filtro Whatman No. 1

Pipetas Pasteur

Pipetas serológicas de 1, 2, 5 y 10 ml

Probetas de vidrio de 100, 500 y 1000 ml

Termómetros hasta de 100°C

Tubos de ensaye Pyrex de 13 X 100 mm

Tubos de ensaye Pyrex de 15 x 125 mm con tapón de rosca.

Vasos de precipitados de 250 ml

3.2.3.- Reactivos.-

Acido Ascórbico (Q.P)	(J.T. Baker)
Bicarbonato de Sodio (Q.P) al 4.4%	(Lab In Vitro)
Citrato de Amonio Férrico (Q.P)	(Merck)
Cisteina (Q.P)	(Sigma)
Cloruro de Sodio (Q.P)	(J.T.Baker)
Dextrosa (Q.P)	(J.T.Baker)
Extracto de Levadura (Q.P)	(Bioxon)
Fosfato de Potasio Dibásico (Q.P)	(J.T.Baker)
Fosfato de potasio Monobásico (Q.P)	(J.T.Baker)
L-glutamina (U.S.G.L)	(Lab In Vitro)
Medio F-12 10X	(Lab In Vitro)
Mezcla de Antibióticos (contiene 10,000 unidades de Penicilina y 10 mg de Strep- tomicina por 1 ml en 0.9% de cloruro de sodio).	(Lab In Vitro)
Mezcla Vitamínica (Biotin, ácido fólico, glicina, mio-inositol 100 mg; ácido ni- cotinico 0.5 mg; tiamina 0.1 mg; piridoxina y HCl 0.5 mg;(para 250 ml)	(Microlab)
Peptona Tripticasa	(Bioxon)
S-Adenosil-L-Homocisteina (U.S.G.L)	(Sigma)
Suero Fetal Bovino 3 ml/100 ml	(Microlab)
Tripsina Verseno 0.05%/100 ml	(Lab In Vitro)
III Oxima de Indio (Q.P) vida media de 6 horas.	(Amershan Int.)
** (U.S.G.L) Para uso de gabinete y del Laboratorio.	

3.2.4.- Equipo.-

Autoclave (Presto)
 Agitador Magnético (Medi-Lab)
 Balanza Analítica (Mettler AE-163)
 Bomba de Vacío Manual
 Centrifuga Clínica (International Mod. CLM-4-148)
 Congelador (Ultra Low)
 Contador de Radiactividad (Gamma Packard)
 Estufa (Mod. HDY-27)
 Flujo Laminar (Veco)
 Incubadora (Medi-Lab Mod EH-20P)
 Microscopio de Luz (Carl-Zeiss)
 Microscopio (Olympus BH-12)
 Potenciómetro (Corning)
 Refrigerador (Whirpool)
 Ultra Centrifuga (Sorvall Mod RT-6000B)

3.2.5.- Preparación de Reactivos.

3.2.5.1.- Cultivo Axénico de E. histolytica cepa HMI-IMSS:

Medio de Cultivo TYI-S-33.- Caldo tripticasa.- Pesar 2 g de peptona tripticasa, 1 g de extracto de levadura; 1 g de dextrosa; 0.2 g de cloruro de sodio; 0.06 g de fosfato de potasio monobásico; 0.1 g de fosfato de potasio dibásico; 0.1 g de cisteína; 0.002 g de ácido ascórbico; 0.00228 g citrato de amonio férrico y 82 ml de agua bidestilada.

Procedimiento: Disolver los reactivos en el orden presentado, en aproximadamente 40 ml de agua bidestilada, ajustar el pH de 6.8 a 6.9 con hidróxido de sodio al 1%, llevar después a un volumen de 82 ml con agua bidestilada. Filtrar el medio en papel

filtro Whatman No 1 y esterilizar en autoclave a 121 libras por 15 minutos.

Suero Bovino Inactivado.— El suero se adquirió en los Lab. Microlab. Descongelar y llevar a baño maría a 56°C durante 30 minutos.

Solución de Vitaminas.— La solución se adquirió en los Lab. Microlab.

Preparación del Medio de Cultivo TYI-S-33 .- A cada 82 ml de medio, agregar 4 ml de solución de vitaminas y 15 ml de suero bovino inactivado.

Prueba de Esterilidad.— El medio de cultivo TYI-S-33 completo, se deja incubar a 37°C durante 24 horas, con el fin de descartar una posible contaminación.

Cálculo de Trofozoitos por Mililitro.— Elegir el tubo con mayor crecimiento, llevando los trofozoitos a una concentración de 1 ml. El total de trofozoitos se cuenta mediante la cámara de Neubauer y pipeta Pasteur con los siguientes cálculos:

No X A X C

B

No.- Suma de los 5 cuadrantes

A.- Factor para determinar el valor mm^2 (10).

B.- Número de cuadrantes (5)

C.- Factor para determinar el valor por mililitro (1000).

Inoculación de Trofozoitos al Medio del Cultivo.— Cultivar E. histolytica cepa HMI-IMSS, utilizar tubos de tapón de rosca de 15 X 150 mm en los que se calculó 4×10^9 de trofozoitos por 12 ml de medio. Colocar el tubo elegido en hielo durante 5 minutos para desprender los trofozoitos de la pared del tubo. Proceder a sembrar incubando a 37°C durante

48 horas.

3.2.5.2.- Cultivo de Línea Celular CHO.-

Tratamiento de Material a Utilizar.- Solución de Cloralex al 1:33.- Tomar una parte de cloralex comercial y llevar a 33 partes de agua.

Solución de Ácido Clorhídrico al 1:66.- tomar una parte de Ácido clorhídrico y llevar en 66 partes de agua.

Procedimiento: Dejar el material en la solución de cloralex al 1:33, durante 24 horas, enjuagar 8 veces con agua corriente y 2 veces con agua destilada, dejar 24 horas en la solución de HCl al 1:66, nuevamente enjuagar 8 veces con agua corriente y 2 veces con agua destilada. El material de vidrio se esteriliza en autoclave a 121 libras por 15 minutos.

Solución Reguladora de Fosfatos.- Pesar 4.5 g de cloruro de sodio, 2.5 g de fosfato de potasio monobásico y 8.009 g de fosfato disódico, disolver en 1000 ml de agua destilada.

Procedimiento: En 90 ml de agua esteril, desionizada y bidestilada, agregar 10 ml de medio F-12 (10 X); 2 ml de suero fetal bovino; 0.1 ml de mezcla de antibióticos; 3 ml de bicarbonato de sodio al 4.4% y 1 ml de L-glutamina. Filtrar con filtro milipore obteniendo la esterilidad del medio.

Mantenimiento de la Línea Celular.- Elegir la caja con el 100% de confluencia, retirar el medio del lado opuesto a las células, agregar 1 ml de tripsina verseno al 0.05%, dejar en un lapso de 1 minuto.

La cantidad de medio que se utiliza depende del número de cajas sembradas, ya que cada caja contiene 5 ml.

3.3.- Metodología.-

3.3.1.- Investigación de la Capacidad de Lisis de E. histolytica en cultivos de células CHO.- Cultivar 2×10^8 células CHO en medio F-12 a 37°C durante 48 horas y llevarlas a confluencia del 100%. Simultáneamente hacer crecer 8×10^4 trofozoitos de E. histolytica en igual periodo y a la misma temperatura.

Transcurrido este tiempo adicionar por cuadruplicado 2, 4, 6 y 8×10^4 trofozoitos de amibas a las células CHO y nuevamente incubar a 37°C por 6 horas. Al término de este periodo observar al microscópio considerando 2 parámetros 1) Adhesión hacia las células, y 2) Destrucción celular, fotografiando la imagen con una cámara Olympus BH2, tomar, como limite de una a cuatro cruces, considerar éstas como porcentaje de lisis observada, en donde (+) corresponde al 25%, (++) al 50%, (+++) a 75% y (++++) 100%.

3.3.2.- Cinética de Lisis de E. histolytica cepa HMI-1N55 cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína sobre cultivos de células CHO. El testigo corresponde a cada concentración.

Solución $10 \mu\text{Mol}$ de S-Adenosil-L-Homocisteína.- pesar 0.003844 g de S-Adenosil-L-Homocisteína, disolver en 10 ml de medio de cultivo TYI-S-33, esterilizar con filtro milipore de No 0.22 μm . De ella manejar cuatro diferentes concentraciones 1, 2.5, 5 y $10 \mu\text{Mol/ml}$.

Procedimiento: Cultivar 2×10^8 células CHO en medio F-12, llevar al 100% de confluencia en un periodo de 37°C , 48 horas. Simultáneamente cultivar trofozoitos de E. histolytica axénicamente en presencia de 1, 2.5, 5 y $10 \mu\text{Mol/ml}$ de S-Adenosil-L-Homocisteína. Incubar los tubos a 37°C . Otro testigo

consiste en adicionar las 4 concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteina sin amibas sobre las células CHO siguiendo el mismo periodo de incubación. Al término de éstos, observar las placas al microscopio, fotografiar las imágenes para demostrar la adhesión celular, así como la presencia o ausencia de lisis.

3.3.3.-Investigación del Efecto Citolítico de E. histolytica cepa HMI-IMSS cultivada en presencia y ausencia de S-Adenosil-L-Homocisteina sobre células CHO, determinada por la liberación de radiactividad y su testigo.

Marca radiactiva en los cultivos de células CHO.-En una caja de polietileno de 50 ml (marca Nunclo) cultivar células CHO, llevadas al 100% de confluencia durante 48 horas a 37° C despegar de la pared adicionando 1 ml de tripsina verseno al 0.05% durante 30 segundos. Retirar la tripsina verseno, para después resuspender en 5 ml de medio TYI sin suero, ni vitaminas, determinar el número y viabilidad en la cámara de Neubauer. Marcar radiactivamente con III Oxima de Indio, incubar 5 minutos a 37° C. Al terminar este tiempo centrifugar a 300 G a 4° C durante 5 minutos y resuspender en 3 ml de medio TYI. Colocar por cuadruplicado, 2 X 10⁶ células CHO en tubos de ensaye, a cada serie adicioar 2, 4, 6 y 8 X 10⁴ trofozoitos cultivados con diferentes concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteina y sin ella. Incubar todos los tubos a 37° C durante 6 horas, transcurrido ese tiempo, centrifugar por 5 minutos a 300 G a 4° C, retirar el sobrenadante y en el sedimento determinar la radiactividad residual con un contador Gamma Packard.

3.4.- Análisis Estadístico.- Los resultados obtenidos se analizaron por Estadística descriptiva. Utilizando las pruebas de Análisis de Varianza y "t" de Student (7), en donde el valor de $p \leq 0.05$ indicó diferencias estadísticamente significativas.

CAPITULO IV

15

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.- Resultados.-

A).- El efecto citolítico que provocan los trofozoitos de E. histolytica (cepa HMI-IMSS) sobre las células CHO se encuentra determinado por la presencia de lisis; para poder observar la ausencia o existencia de este fenómeno, se realizó el primer experimento de este trabajo donde el número de células CHO permaneció constante (2×10^5) y las concentraciones de trofozoitos variables (2, 4, 6 y 8×10^4).

Los resultados de estos estudios se pueden observar en la (Fig 1) en donde se detecta que solamente existen fenómenos de adhesión y mínima destrucción celular, por parte de los trofozoitos, independientemente de la concentración en la que se encuentra.

B).- Se comprobó en un segundo experimento que la S-Adenosil-L-Homocisteina no tiene por sí solo ningún efecto citolítico, para ello se utilizó este aminoácido en concentraciones de $10 \mu\text{Mol/ml}$, (esta concentración fue en la que se observó mayor incremento del efecto virulento sobre los trofozoitos) frente a un número constante de células CHO (2×10^5) (Fig 2).

C).- Los siguientes experimentos se llevaron a cabo con 4 concentraciones diferentes de trofozoitos (2×10^4 , 4×10^4 , 6×10^4 , 8×10^4) en presencia de cuatro concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteina (1, 2.5, 5 y $10 \mu\text{Mol/ml}$); sobre 2×10^5 de células CHO marcadas radiactivamente con III Oxina de Indio

- 1).- Se utilizó una concentración de trofozoitos de 2×10^4 , que se expusieron en presencia de cada una de las cuatro concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína, los resultados de este experimento mostraron una importante alteración morfológica previa a la lisis de las células CHO (presencia de células redondas), esta alteración fue directamente proporcional a la concentración del aminoácido. (Fig 3).
- 2).- En este experimento se utilizó una concentración de 4×10^4 trofozoitos en presencia de las concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína, los resultados mostraron que las células CHO tienden a un mayor grado de redondez aún en la menor concentración del aminoácido, llegándose a una lisis parcial en la última concentración de $10 \mu\text{Mol/ml}$ de S-Adenosil-L-Homocisteína. (Fig 4).
- 3).- El tercer experimento se realizó con una concentración de 6×10^4 trofozoitos/ml bajo las mismas condiciones de concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína, el resultado de este estudio mostró un cambio morfológico en las células CHO en presencia de la primera concentración $1.0 \mu\text{Mol/ml}$ de S-Adenosil-L-Homocisteína y la lisis total se observó en la última concentración de $10 \mu\text{Mol/ml}$. (Fig 5).
- 4).- En este experimento la concentración de trofozoitos fue de 8×10^4 y en la Fig. (6) se pueden observar los resultados; aquí se detectó un efecto citolítico desde la concentración mínima de S-Adenosil-L-Homocisteína ($1.0 \mu\text{Mol/ml}$) siendo total y mayor en la última concentración ($10 \mu\text{Mol/ml}$).
- 5).- En la Tabla I y en la Gráfica I se muestran los resultados de la lisis celular (representada en porcentaje) que fue provocada por concentraciones diferentes de trofozoitos en

distintas concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína, y en ellos se puede observar que el efecto citolítico fué directamente proporcional a la concentración del aminoácido.

- 6).- En la Gráfica II se muestran los resultados del experimento realizado para determinar por radiactividad el efecto citolítico de las amibas, este se llevó a cabo con diferentes concentraciones de trofozoitos en presencia de diferentes concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína sobre 2×10^6 células CHO, se corrió a su vez un testigo al que no se le indujo el aminoácido para poder comparar el efecto citolítico de los trofozoitos con y sin S-Adenosil-L-Homocisteína; los resultados observados sugieren que la lisis celular es directamente proporcional a la concentración del aminoácido y del número de amibas.

Se realizó además un Análisis de Varianza donde F es igual a 28.3 y $<$ igual a 3 con un valor de $p \leq 0.001$ (Tablas II a VII).

Fig. 1

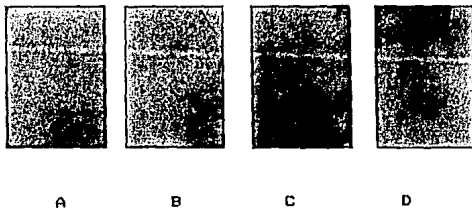
EFFECTO CITOLITICO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE
E. histolytica SOBRE 2×10^6 CELULAS CHO



A) 2×10^4 , B) 4×10^4 , C) 6×10^4 y D) 8×10^4 tro-
fozoitos/ml.

Fig. 2

EFFECTO DE LA S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA SOBRE
CELULAS SIN AMIBAS



A,B,C,D.- Muestra el efecto de $10 \mu\text{Mol/ml}$ de S-Adenosil-L-Homocisteína, sobre 2×10^8 células CHO sin amibas.

GRAFICA I

EFECTO DE LA S-ADENOSIL-L-HOMO- CISTEINA EN LA LISIS CELULAR

XOM JHMHUO QM UWJWJHJH UJHJ

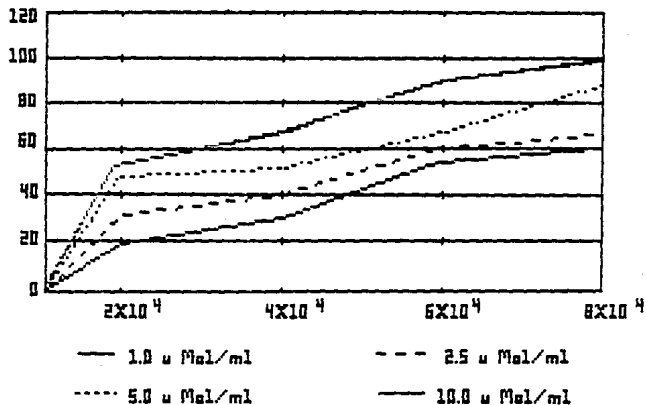


TABLA I
 PORCENTAJE DE LISIS CELULAR DE ACUERDO A LA CONCENTRACION DE S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA

No de Trofozoitos de <u>E. histolytica</u>	Concentración de S-Adenosil-L-Homocisteina			
	1.0, Mol/ml 20 %	2.5, Mol/ml 30 %	5.0, Mol/ml 45 %	10.0, Mol/ml 50 %
2 x 10 ⁶				
4 x 10 ⁶	35	40	50	65
6 x 10 ⁶	55	60	65	85
8 x 10 ⁶	60	65	80	100

Fig. 3

EFFECTO CITOLITICO DE 2×10^6 TROFOZOITOS DE E. histolytica CULTIVADOS EN S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA



A B C D

A) 1.0, B) 2.5, C) 5.0 y D) $10.0 \mu\text{Mol/ml}$ de S-Adenosil-L-Homocisteina.

Fig. 4

EFFECTO CITOLITICO DE 4×10^6 TROFOZOITOS DE E. histolytica CULTIVADOS EN S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA



A B C D

A) 1.0 , B) 2.5 , C) 5.0 y D) $10.0 \mu\text{Mol/ml}$ de S-Adenosil-L-Homocisteina.

Fig. 5

EFEECTO CITOLITICO DE 6×10^4 TROFOZOITOS DE E. histolytica CULTIVADOS EN S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA



A

B

C

D

A) 1.0 , B) 2.5 , C) 5.0 y D) 10.0 μ Mol/ml de S-Adenosil-L-Homocisteina.

Fig. 6

EFEECTO CITOLITICO DE 8×10^4 TROFOZOITOS DE E. histolytica CULTIVADOS EN S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA



A

B

C

D

A) 1.0 , B) 2.5 , C) 5.0 y D) 10.0 μ Mol/ml de S-Adenosil-L-Homocisteina.

GRAFICA II

EFECTO CITOLITICO DE AMIBAS

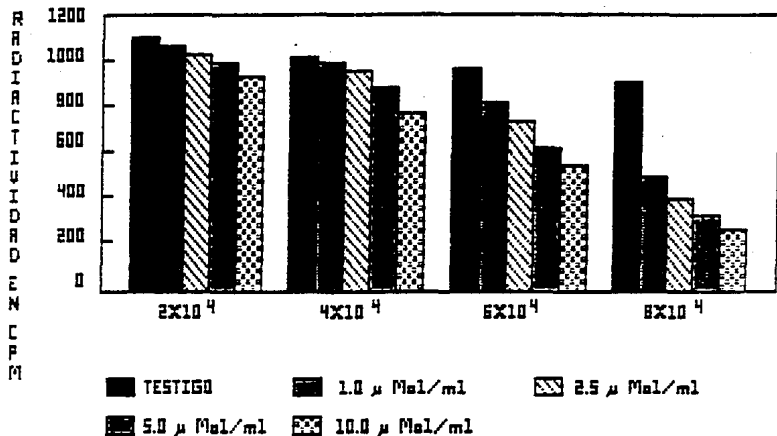


TABLA II

RADIATIVIDAD RESIDUAL DE CELULAS CHO (2×10^5)
 EN PRESENCIA DE AMIBAS CULTIVADAS CON DIFERENTE
 CONCENTRACION DE S-ADENOSIL-L-HOMOSISTEINA

NUMERO DE DETERMINACIONES	NUMERO DE AMIBAS	TESTIGO c. p. m.	Concentración de S-Adenosil-L-Homocisteina			
			1.0 μ Mol/ml	2.5 μ Mol/ml	5.0 μ Mol/ml	10.0 μ Mol/ml
4	2×10^6	1050 \pm 513	1025.25 \pm 343	980.70 \pm 403	940.75 \pm 240	875.25 \pm 422
4	4×10^6	975 \pm 137	945.75 \pm 523	910 \pm 213	810.75 \pm 225	690.5 \pm 201
4	6×10^6	925.25 \pm 220	760.75 \pm 240	650 \pm 344.5	460 \pm 113	400.25 \pm 193
4	8×10^6	845 \pm 402	351 \pm 211	260.25 \pm 92	175 \pm 565	100.5 \pm 88

c. p. m. = Cuentas por minuto.

TABLA III
COMPARACION DE VARIANZA

NUMERO DE DETERMINACIONES n	NUMERO DE ANIBAS	TESTIGO c. p. m.	Concentración de S-Adenosil-L-Homocisteína			
			1.0 μ mol/ml	2.5 μ mol/ml	5.0 μ mol/ml	10.0 μ mol/ml
4	2×10^4	$S^2 = 104059.66$	$S^2 = 46448.25$ * (.0285 , 6.886)	$S^2 = 64060.91$ * (.0593 , 9.5)	$S^2 = 22755.58$ * (.01399 , 3.375)	$S^2 = 70536.91$ * (.0433 , 10.45)
4	4×10^4	$S^2 = 7387.66$	$S^2 = 108860.58$ * (.935 , 225.73)	$S^2 = 17868$ * (.154 , 37.33)	$S^2 = 20028.91$ * (.173 , 41.85)	$S^2 = 16213.66$ * (.14 , 33.81)
4	6×10^4	$S^2 = 19265.50$	$S^2 = 22768.91$ * (.075 , 18.21)	$S^2 = 46614.99$ * (.154 , 37.36)	$S^2 = 5020.66$ * (.016 , 4.01)	$S^2 = 14688.58$ * (.048 , 11.76)
4	8×10^4	$S^2 = 63964.66$	$S^2 = 17660.00$ * (.0176 , 4.26)	$S^2 = 3343.58$ * (.0033 , .802)	$S^2 = 1262$ * (.0012 , .293)	$S^2 = 3856.33$ * (.003 , .725)

c. p. m. = Cuentas por minuto.

* Intervalos de Confianza entre Concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína y número de anibas (95% de confianza)

Se fija Número de Trozositos y de Testigo.

TABLA IV

COMPARACION DE VARIANZAS ENTRE CONCENTRACIONES DE S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA Y NUMERO DE TROFOZOITOS (2 X 10⁴)

	1.0 μ Mol/ml	2.5 μ Mol/ml	5.0 μ Mol/ml	10.0 μ Mol/ml
1.0 μ Mol/ml	$S^2 = 46448.25$ ** 1	$S^2 = 64060.91$ * (.088 , 21.291)	$S^2 = 22755.58$ * (.0312 , 7.55)	$S^2 = 70536.91$ * (.097 , 23.437)
2.5 μ Mol/ml	$S^2 = 46448.25$ * (.046 , 11.12)	$S^2 = 64060.91$ ** 1	$S^2 = 22755.58$ * (.022 , 5.48)	$S^2 = 70536.91$ * (.07 , 16.98)
5.0 μ Mol/ml	$S^2 = 46448.25$ * (.13 , 31.5)	$S^2 = 64060.91$ * (.18 , 43.38)	$S^2 = 22755.58$ ** 1	$S^2 = 70536.91$ * (.198 , 47.89)
10.0 μ Mol/ml	$S^2 = 46448.25$ * (.042 , 10.2)	$S^2 = 64060.91$ * (.057 , 13.9)	$S^2 = 22755.58$ * (.02 , 4.97)	$S^2 = 70536.91$ ** 1

* Intervalos de Confianza entre las Concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteina.

** La comparación entre las Varianzas de una misma Concentración va a ser = 1.

TABLA V

COMPARACION DE VARIANZAS ENTRE CONCENTRACIONES DE S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA Y NUMERO DE TROFOZOITOS (4 X 10⁴)

	1.0 $\mu\text{Mol/ml}$	2.5 $\mu\text{Mol/ml}$	5.0 $\mu\text{Mol/ml}$	10.0 $\mu\text{Mol/ml}$
1.0 $\mu\text{Mol/ml}$	$S^2 = 108061.58$ ** 1	$S^2 = 17868$ * (.01 , 2.54)	$S^2 = 20028.91$ * (.911 , 2.85)	$S^2 = 16213.66$ * (.0096 , 2.316)
2.5 $\mu\text{Mol/ml}$	$S^2 = 108061.58$ * (.39 , 93.25)	$S^2 = 17868$ ** 1	$S^2 = 20028.91$ * (.071 , 17.29)	$S^2 = 16213.66$ * (.058 , 14.05)
5.0 $\mu\text{Mol/ml}$	$S^2 = 108061.58$ * (.344 , 83.22)	$S^2 = 17868$ * (.06 , 13.74)	$S^2 = 20028.91$ ** 1	$S^2 = 16213.66$ * (.051 , 12.5)
10.0 $\mu\text{Mol/ml}$	$S^2 = 108061.58$ * (.43 , 102.8)	$S^2 = 17868$ * (.07 , 16.9)	$S^2 = 20028.91$ * (.078 , 19)	$S^2 = 16213.66$ ** 1

* Intervalos de Confianza entre las Concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteina.

** La comparación entre las Varianzas de una misma Concentración va a ser = 1.

TABLA VI

COMPARACION DE VARIANZAS ENTRE CONCENTRACIONES DE S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA Y NUMERO DE TROFOZOITOS (6 x 10⁶)

	1.0 μ mol/ml	2.5 μ mol/ml	5.0 μ mol/ml	10.0 μ mol/ml
1.0 μ mol/ml	S ² = 22768.91 ** 1	S ² = 46614.99 * (.13 . 31.49)	S ² = 5020.66 * (.014 . 3.35)	S ² = 14685.58 * (.041 . 10.036)
2.5 μ mol/ml	S ² = 22768.91 * (.031 . 7.56)	S ² = 46614.99 ** 1	S ² = 5020.66 * (.007 . 1.69)	S ² = 14685.58 * (.02 . 4.86)
5.0 μ mol/ml	S ² = 22768.91 * (.2 . 70.4)	S ² = 46614.99 * (.59 . 143.28)	S ² = 5020.66 ** 1	S ² = 14685.58 * (.186 . 45.08)
10.0 μ mol/ml	S ² = 22768.91 * (.099 . 23.9)	S ² = 46614.99 * (.2 . 48.9)	S ² = 5020.66 * (.021 . 5.25)	S ² = 14685.58 ** 1

* Intervalos de Confianza entre las Concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteina.
 ** La comparación entre las Varianzas de una misma Concentración va a ser = 1.

TABLA VII

COMPARACION DE VARIANZAS ENTRE CONCENTRACIONES DE S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA Y NUMERO DE TROFOZOITOS (8 X 10⁴)

	1.0 μ mol/ml	2.5 μ mol/ml	5.0 μ mol/ml	10.0 μ mol/ml
1.0 μ mol/ml	S ² = 17660.00 ** 1	S ² = 3343.58 * (.012, 21.91)	S ² = 1262 * (.0045, 1.096)	S ² = 3056.33 * (.011, 2.67)
2.5 μ mol/ml	S ² = 17660.00 * (.337, 81.52)	S ² = 3343.58 ** 1	S ² = 1262 * (.24, 5.82)	S ² = 3056.33 * (.058, 14.112)
5.0 μ mol/ml	S ² = 17660.00 * (.895, 21.6)	S ² = 3343.58 * (.17, 40.9)	S ² = 1262 ** 1	S ² = 3056.33 * (.155, 37.38)
10.0 μ mol/ml	S ² = 17660.00 * (.37, 89.24)	S ² = 3343.58 * (.07, 16.82)	S ² = 1262 * (.026, 6.36)	S ² = 3056.33 ** 1

* Intervalos de Confianza entre las Concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteina.

** La comparación entre las Varianzas de una misma Concentración va a ser = 1.

4.2.- Discusión

Los resultados "in vitro" sobre el efecto citolítico mostraron que el incremento en las concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína en los cultivos de amibas fué directamente proporcional a la lisis de las células blanco, en donde la fase inicial, fue un cambio en la morfología de las células CHO, las cuales se redondearon y finalmente se lisaron en mayor número que en los testigos (Fig 3 a la 6).

Esto sugiere varias probabilidades; a) que la S-Adenosil-L-Homocisteína incrementó las cargas y la conductancia en la membrana del trofozoito (como sucede en los leucocitos) al adicionar formil péptidos, esto favoreció el paso de iones calcio y potasio y con ello la reorganización de los elementos contráctiles y consecuentemente la fagocitosis, este fenómeno ha sido ya descrito en experimentos llevados a cabo por el análogo estructural de la S-Adenosil-L-Homocisteína, la S-Adenosil-Metionina (10,36,49 51).

El hecho de que el fenómeno de lisis de E. histolytica se llevara a cabo en forma directamente proporcional a la concentración de S-Adenosil-L-Homocisteína sugiere que se trata de un efecto de superficie por lo que se puede inferir, que existen receptores en la membrana de E. histolytica para la S-Adenosil-L-Homocisteína semejante a los que sucede con formil péptidos en los leucocitos; b) que la S-Adenosil-L-Homocisteína logra penetrar a la amiba llevando a cabo su efecto sobre la inhibición de las metil transferasas, de tal manera que la fosfatidil etanolamina no puede metilarse para formar

fosfaticolina. Esta modificación en los fosfolípidos de membrana, puede facilitar la penetración de iones calcio y de esta manera activar las estructuras quimiotáctiles como la actina y la miosina que participan en la fagocitosis (36 , 37) y c) La participación de la enzima glutaril ciclasa, que en presencia de GTP forme GMPc; ésta a su vez degrada la fosfatidil colina en lisofosfatidil colina y ácido araquidónico, y como ya se mencionó la presencia de S-Adenosil-L-Homocisteína inhibe a las metiltransferasas, el recambio de fosfolípidos de membrana facilita la fagocitosis y da una explicación al incremento en la cantidad de lisis de las células blanco como se observó en los resultados.

El efecto citolítico se observó solamente en presencia de trofozoitos, esto fue demostrado mediante el experimento de la S-Adenosil-L-Homocisteína con las células CHO, y se observó que el aminoácido no tiene ningún efecto citopático sobre las células.

Estos resultados se confirmaron también en forma cuantitativa cuando las células CHO fueron marcadas radiactivamente con III Oxima de Indio, fueron lisadas por trofozoitos cultivados con diferentes concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína, en donde el número de cuentas por minuto (c.p.m.) correspondió a la radiactividad residual demostrándose que la lisis fue directamente proporcional a la concentración de S-Adenosil-L-Homocisteína adicionada a los cultivos y al número de amibas - utilizadas (Tabla II).

En este trabajo se estudio uno de los parámetros de virulencia de E. histolytica como es la fagocitosis, en donde se pudo observar que el fenómeno fue incrementado en forma directamente

proporcional a la concentración de S-Adenosil-L-Homocisteína y al número de trofozoitos de E. histolytica.

Con ello se infiere que la capacidad fagocítica de E. histolytica puede modificarse como se demuestra en este estudio al adicionar diferentes concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína, dando la evidencia de la facultad que tiene este protozoario para comportarse de diferente manera frente al huésped, desarrollándose la enfermedad o ausencia de ella en el mismo.

CAPITULO V

34

CONCLUSIONES

- 1.- Se estudió el efecto citolítico de E. histolytica cepa HMI-IMSS cultivada en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína observándose un incremento en la capacidad fagocítica de las amibas en forma directamente proporcional a la concentración de S-Adenosil-L-Homocisteína. Este fenómeno, en forma inicial, fue morfológico para posteriormente destruir completamente a las células blanco.
- 2.- Cuando las células CHO fueron marcadas radiactivamente e incubadas con trofozoitos cultivados con diferentes concentraciones de S-Adenosil-L-Homocisteína, el fenómeno de lisis determinado por la radiactividad liberada fue estadísticamente significativo con respecto a los testigos en donde se observó una lisis mucho menor.
- 3.- Al utilizar la máxima concentración de S-Adenosil-L-Homocisteína ($10 \mu\text{Mol/ml}$) en cultivos de células CHO, no se dió ningún efecto tóxico durante el tiempo de incubación. Por lo que se puede asegurar que las alteraciones sobre las células CHO son debidas a las amibas y al efecto de la S-Adenosil-L-Homocisteína sobre la virulencia de las amibas.
- 4.- Se propone que la fagocitosis de las amibas se incrementó con la presencia de S-Adenosil-L-Homocisteína y que el fenómeno responsable es probablemente combinado, es decir: cambios a nivel membrana en forma inicial y en forma posterior cambios intracelulares por la inhibición sobre las transmetilasas. Se puede suponer que el fenómeno de virulencia puede alterarse por diferentes factores en donde las sustancias que rodean al protozoario pueden determinar el comportamiento diferente de éste.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ambrosies, K., Peña, R. Patología de la Amibiasis. Rev. Hosp. Infantil de Méx. 743: 453-465; 1986.
- 2.- Annesley J: Researchs in to the causes, nature and treatment of the more prevalent diseases in India and of warm climates generally. London: Logman, 378-381, 1828.
- 3.- Arellano, M.T., Ortiz-Ortiz. L. Algunas propiedades de la globulina específica del suero de pacientes con absceso hepático amibiano. Arch. de Invest. Med (Méx.5); supl 2: 487-490, 1974.
- 4.- Biagi, F. Enfermedades Parasitarias. La Prensa Médica Mexicana, S.A., 2da. Ed. 7a. Reimpresión México. 81-124; 1982.
- 5.- Bracha, R., Mirelman, D. Virulence of Entamoeba histolytica Trofozoitos. J. Exp. Med. 160; 353-368: 1984.
- 6.- Brandt, H., Pérez-Tamayo, R. The Pathology of human amibiasis. Hum Pathol 1; 351-385: 1970.
- 7.- Bruning, L.J., Kintz. The t-Test for a Difference Between a sample Mean and the population mean 8-10 Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 109; 321: 1970.
- 8.- Calderón, J., Tovar-Gallegos, G.R. Resistance to inmuno lysis induced by antiboides in E. histolytica. In the host Invader Inter play, H. Vanden Bossche. E' sevier/North Holland. Amsterdam. 3; 227-239: 1986.
- 9.- Cervantes, M.A., Martínez, P.A. Estudio del ciclo E. invadens Mediante cinematografía espaciada. Arch. Invest. Med. (Méx); (Supl 1); 31-40: 1980.
- 10.- Cochrance, G.C. Mechanismis coupling stimulation and funtion in leukocytes. Federation Proceedings. 43 (12); 2729-2731: -

1984.

- 11.-Councilman, W.T., La Fleur, H.S. Report in pathology. Amebic dysentery. Johns Hopkins Hospital Report. 2; 395-548: 1891.
- 12.-Chavez, A., Sepúlveda, B., Segura, M., Corona, D., Diaz, J. Confrontación de Trofozoitos con células aisladas de la mucosa del colon. Libro de Memorias de la conferencia Internacional sobre Amibiasis. 422-427: 1985.
- 13.-Das, S.R., Goyal, S. Restoration of virulence to rat axenically grown E. histolytica by cholesterol and Hamster; liver passatge and trap. Med. Parasitol. 70; 439-444: 1976.
- 14.-Del Castillo, F. En: Fournier V., ed Bibliografía Mexicana del absceso hepático. México, D.F. La Prensa Médica Mexicana 1956.
- 15.-Diamond, L.S. Techniques of cultivation of E. histolytica Schadin 1903 an E. histolytica like amebae. J. Parasitol. 54; 1047-1056: 1969.
- 16.-Dixon, M., Webb, C.E. Enzymes. 1a. ed. Freeman and company Sn. Francisco. 266-267: 1975.
- 17.-Durin, B., Chayen, A., Stolarcky, T. Schavger, R., Mirelman, D. Novel sialic acid containig. Glicoproteins are produced during cystation of Entamoeba culture. Proc. Natl. Acad. Sci. (74) 3; 878-882: 1977.
- 18.-Ellen, L.I. Becker, A., Stanley, L.S. Jr. Use of Chinese Hamster Ovary Cells with altered glycosylation patterns to define the carbohydrate specificity of E. histolytica adhesion. J. Exp. Med. 167: 1725-1730: 1988.
- 19.-Garfinkel, L., Giladi, M., Huber, M., Giltler, C., Mirelman, D., Revel, M., Rozenblatt, S. DNA probes specific for E. histolytica posing Pathogenic and Non pathogenic Zymode

- nos. Infection and Immunity. 57 (3): 926-931: 1989.
- 20.-Guerrant, R.L. Amebiasis introduction current status, and research question. Infect Dis B (92); 218-227: 1986.
- 21.-Gutiérrez, G. Características principales de la amibiasis invasora en el niño Actualización de algunos conceptos clínicos y epidemiológicos. Arch. Invest. Med. (supl 1); 281-286: 1980.
- 22.-Hirata., F. Chemoattractants stimulate degradation of methylated phospholipids and release of arachidonic acid in rabbit leukocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76; 2640-2643: 1979.
- 23.-Jiménez. Scherer, Pacheco, A.G., Cruz de Lavín, E., Hernández, P., Kretschmer, R. Cambios Estructurales asociados a la Inhibición de la quimiotaxis de monocitos humanos provocado. Prov. de E. histolytica cultivada en medio axénico. Arch. Invest. Med. (Méx) (supl 17); 251-254: 1986.
- 24.-Kartulis, S. Zur Aetiologie der Dysenterie in aegypten. Virchow Arch. der Path Anatom. 105; 521-531: 1886.
- 25.-Keller, F., Walter, C. Pathogenic and non-pathogenic E. histolytica pore formation and hemolytic activity. J. Protozool 35 (3), 359-365: 1988.
- 26.-Kobielier, D., Mirelman, D. Adhesión of E. histolytica Trophozoites to monolayers of human cells. The J. of Inf. Dis. 144; 539-546: 1981.
- 27.-Kumate, J., Gutiérrez, G. Manual de Infectología. Ed. Médicas del Hosp. Inf. de Méx. 6a. Ed. 56-65: 1978.
- 28.-Lamble, W. Beobachtungen un studien auf dem gebiet der pathologischen Anatomie un Histologia. En: Loeschener WD ed.

Theil I. A. Aus dem Frans Joseph Paediatrik insbensondete.
Prag. Friedrich Tempsky 1860.

- 29.-Levine, N.D. et al. Nueva Clasificación de los Protozoarios.
J. Protozool. 27 (1); 37-58: 1980.
- 30.-Losch, F. Massenhafte Entwchlung von Amoben in Dickdarm.
Virchow Arch. der Path Anatomic 65; 196-211: 1875.
- 31.-Meerovitch, E., Ghardirran, E. Restoration of virulence of
axenically culturated E. histolytica by Cholesterol, Can. J.
Microbiol. 24; 63-65: 1978.
- 32.-Montfort-Pérez, R., Ostoa-Saloma, P., Medina-Velázquez. L.,
Montfort, I., Becker, I. Catalytic classes of proteinases
of E. histolytica. Molecular and Biochemical Parasitology.
26; 87-98: 1979.
- 33.-Murrell, L.R. Vertebrate cell culture An Ovarview. Academia
Press, Inc. 9-20: 1979.
- 34.-Orozco, Ma. E., Martínez-Palomo, A., González, A., Guarneros,
C., Galindo, J. Las interacciones entre lectina y receptor
mediante la adherencia de E. histolytica a células e-
piteliales, relación de la adhesión con la virulencia de las
cepas. Arch. Invest. Med 13 (Supl 3); 159-167: 1982.
- 35.-Orozco, E., Rodríguez, Ma., Murphy, Ch., Salata, R.A. Rad-
vin, J. I. Actividad mitogénica y de lectina en mutantes de
E. histolytica deficientes en virulencia. Arch. Invest. Med
(Mex) 17 (Supl); 167-172: 1986.
- 36.-Pike. M.C., Kredich, N. M., Synderman, R. Role of transmety-
lation reactions in cellular motility and phagocytosis. Mol.
Immunol. 17; 209-218: 1980.
- 37.-Pintein, M.C., Kredich, N. M., Synderman, R. Requirement of
S-Adenosil-L-methionine-medited methylation for human mono-

- cyte chemotaxis. Prac. Nath. Sci. USA. 75; 3928-3932: 1978.
- 38.-Radvin, J.I., E. histolytica. From Adherence to Enteropathy The Journal of Inf. Dis. 159 (3); 420-429: 1989.
- 39.-Radvin, J.I., Croft, B., Guerrant, L. R. Cytopathogenic mechanisms of E. histolytica. J. Exp. Med. 152; 377-390: 1980.
- 40.-Radvin, J. I., Guerrant, L. R. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of E. histolytica. J. Clin. Invest. 68; 1305-1313: 1981.
- 41.-Radvin, J. I., Guerrant, R. Separation of adherence cytolytic and phagocytic events in the cytopathogenic mechanisms of E. histolytica. Arch. Invest. Med. 13 (Supl 3); 123-128: 1982.
- 42.-Radvin, J.I., Guerrant, L.R., Sperela, K. E. histolytica: impedance measurement and cytocholasini. D. Exp. Parasitol. 60-65: 1985.
- 43.-Radvin, J.I., Murphy, Ch. F., Salata, R., Guerrant, R., Hewlett, E. N-Acetyl-D-Galactosamine-Inhibitible adherence lectin of E. histolytica. I. Partial purification and to Amoebic virulence in vitro. The J. of Inf. Dis. 151; 804-815: 1985.
- 44.-Rodriguez, M.A., Drozco, E. Isolation and Characterization of phagocytosis and virulence deficient mutants of E. histolytica. J. Inf. Dis. 154 (1); 27-32: 1986.
- 45.-Schaudind, F. Untersuchungen uber die For Falozung einiger Rhizopoden. Arbeiten aud dem karsel. Gesundheitsamt. 19; 547-563: 1902.
- 46.-Schiffmann, E., O' Dea. R.F., Chrang, P. K., Venkatasubgmanian. Cocoran, F., Hirata, J. Axelrod in Modulation of prokein function, Academic Press, New York, 4; 299: 1979.

- 47.-Sepúlveda, B., Martínez-Palomo, A. Amebiasis, En: Warren, K. S., Mahmoud, A. Tropical and geographical Medicine. Mc. Graw Hill, New York. 305: 1984.
- 48.-Seymour, C.B., Mothesill C. The effect of glycolysis inhibitors on the recovery of CHO-K1 cells from split-Dose irradiation. Acta Oncologica, 26 fas 5; 367-371: 1987.
- 49.-Stolssel, P., Thomas, Hartwing, H. John, Vin, L. Helen, Southwick S., Fred and Zaner, S. Ken The motor of leukocytes. Federation Procee Dings. 43 (12); 2760-2763: 1985.
- 50.-Stryer, L. Biochemistry. Segunda Edicion Freeman and Company. Sn. Francisco. 908-909: 1975.
- 51.-Synderman, R., Goetzl, J.E. Molecular and Celular Mechanisms of leucocyte Chemotaxis. Science, 213; 830-837: 1981.
- 52.-Tay, S.J., Lara. A.R., Velasco, C.O., Gutiérrez, Q.M. La Amibiasis por E. histolytica. Parasitología Médica. México 49-68: 1982.
- 53.-Trissi, D., Martínez-Palomo, A., de la Torre, M., de la Hernández R., Pérez de Suárez, E. Surface properties of Entamoeba: Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenis strains. J. of Exp. Med. 148; 1137-1145: 1978.
- 54.-Valadez, A., López, C. Cytopathogenicity of E. histolytica a cytoplasmic heat stable factor stimulates DNA syntesis in mamalian cells. Arch. Invest. Med. 17 (Supl); 179-185: 1986.
- 55.-Walls, J.A. Problems in Recognition and diagnosis of amebiasis estimation of the global magnitude of morbidity and mortality Rev. Infect. Dis. 8; 228-238: 1986.
- 56.-Wilttrout, R., Frost, P., Cumnigs. G.D. Isotope-Release Cytocoty assay with the use of Oxima Indium 111. J. Natl. Can-

cer Inst. 61; 183-188: 1987.

- 57.-Wittner, M.S. Rosenbaum, R.M. Role of bacteria in modify virulence of E. histolytica, studies of amoebae from axenic cultures. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19; 755-767: 1970.