

00361

6

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"Papel de la adhesión, de la fagocitosis y de la
interacción con bacterias en la virulencia de
Entamoeba histolytica"**

T E S I S

**Que para obtener el grado académico de
Maestro en Ciencias**

P R E S E N T A

GUILLERMINA GARCIA RIVERA

México, D. F.

1987

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

Lista de figuras	i
Lista de tablas	ii
Abreviaturas	iii
<u>Resumen</u>	1
<u>Introducción</u>	4
<u>Objetivos</u>	36
<u>Materiales y Métodos</u>	
Cultivo de <u>Entamoeba histolytica</u>	37
Eritrocitos humanos	37
Cultivo de células epiteliales de la línea MDCK	38
Cultivo de bacterias	38
Selección de poblaciones amibianas deficientes en adhesión a eritrocitos	39
Clonación en agar semisólido	41
Adhesión de trofozoítos a eritrocitos	43
Adhesión de trofozoítos a células epiteliales	43
Efecto citopático sobre células epiteliales	44
Fagocitosis de eritrocitos	45
Fagocitosis de esferas de látex	46
Ensayo de hemaglutinación	46

Ensayo de virulencia " <u>in vivo</u> "	48
Dosis media de virulencia	49
Virulencia de los trofozoítos en interacción con bacterias	49
Adhesión de trofozoítos en interacción con bacterias	50
Eritrofagocitosis de los trofozoítos en interacción con bacterias	50
Efecto citopático de los trofozoítos en interacción con bacterias	52
Actividad tóxica de los trofozoítos en interacción con bacterias	52
Efecto citopático de los trofozoítos en interacción con eritrocitos humanos	57
"Actividad de toxina" de los trofozoítos en interacción con eritrocitos humanos	57

Resultados

Selección de poblaciones amibianas deficientes en adhesión a eritrocitos	58
Adhesión a eritrocitos	62
Formación de colonias en agar semisólido	62
Eficiencia de adhesión a eritrocitos humanos de las clonas SA 2 ⁻	67
Fagocitosis de eritrocitos de las clonas SA 2 ⁻	68
Fagocitosis de esferas de látex	73
Actividad de lectina de las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos	78

Adhesión y efecto citopático sobre células epiteliales en cultivo	80
Virulencia de las clonas deficientes en adhesión	82
Interacción con bacterias	85
Dosis absceso media	86
Efecto de las bacterias sobre la virulencia " <u>in vivo</u> " ..	92
Efecto de las bacterias en la adhesión	93
Efecto de las bacterias en la critrofagocitosis	93
Efecto citopático de los trofozoítos en interacción con bacterias	98
Actividad de toxina de los extractos amibianos en interacción con bacterias	102
Efecto de los eritrocitos humanos sobre el efecto citopático y citotóxico	106
<u>Discusión</u>	112
<u>Conclusiones</u>	131
<u>Bibliografía</u>	133
<u>Apéndice</u>	149

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Selección de trofozoítos deficientes en adhesión a eritrocitos humanos.
- Figura 2 Adhesión de trofozoítos de la población SA 2⁻ a eritrocitos humanos.
- Figura 3 Eficiencia de formación de colonias en agar semisólido.
- Figura 4 Adhesión de trofozoítos de las clonas SA 2⁻ a eritrocitos humanos.
- Figura 5 Eritrofagocitosis de las clonas SA 2⁻.
- Figura 6 Fagocitosis de esferas de látex por las clonas SA 2⁻.
- Figura 7 Activación de la virulencia mediada por bacterias de la cepa HMI:IMSS, HK9 y de la clona L-6.
- Figura 8 Activación de la eritrofagocitosis mediada por bacterias de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23.
- Figura 9 Activación del efecto citopático mediado por bacterias de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23.

Figura 10 Activación del efecto citotóxico mediado por bacterias de la cepa HK9, y de las clonas A, L-6 y 23.

Figura 11 Efecto citopático en interacción con eritrocitos humanos de los trofozoítos de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23.

Figura 12 Efecto citotóxico de los extractos amibianos en interacción con eritrocitos humanos de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23.

LISTA DE TABLAS.

- Tabla I Relación de adhesión y fagocitosis de clonas SA 2⁻.
- Tabla II Actividad de lectina de clonas deficientes en adhesión.
- Tabla III Adhesión y efecto citopático sobre células epiteliales en cultivo.
- Tabla IV Virulencia de clonas deficientes en adhesión a eritrocitos humanos.
- Tabla V Propiedades de virulencia y origen de varias cepas y clonas de E. histolytica.
- Tabla VI Efecto de las bacterias sobre la adhesión de E. histolytica a eritrocitos humanos.

ABREVIATURAS

- A Clona A, virulenta aislada a partir de HM1:IMSS, obtenida en el C.I.E.A. (Méx.). (Orozco, 1981).
- DMEM Medio Eagle modificado por Dulbecco. (Eagle, 1959).
- E. coli CR34 Tim⁻ Enterobacteria Escherichia coli de la cepa CR34, deficiente en la síntesis de timina.
- EFC Eficiencia de formación de colonias.
- HK9:NIH Cepa silvestre de E. histolytica, de virulencia atenuada aislada de disentería en Korea. (Diamond, 1968).
- HM1:IMSS Cepa silvestre de E. histolytica, virulenta aislada de disentería en el IMSS (Méx.). (De la Torre y col., 1971).
- L-6 Clona L-6, deficiente en virulencia, aislada a partir de HM1:IMSS, obtenida en el C.I.E.A. (Méx.). (Orozco, 1981).
- MDCK Madin Darby Cell Kidney. Línea celular aislada de riñón de perro.

- PBS Solución amortiguadora de fosfatos.
- SA 1⁻ Primera población de trofozoítos deficientes en adhesión a eritrocitos humanos, seleccionada a partir de la cepa HM1:IMSS.
- SA 2⁻ Segunda población de trofozoítos deficientes en adhesión a eritrocitos humanos, seleccionada a partir de la población SA 1⁻.
- TYI-S-33 Medio de cultivo para E. histolytica. (Diamond. y col., 1978).
- TYI-S-33c Medio de cultivo para E. histolytica suplementado con suero bovino, vitaminas y antibióticos.
- 23 Clona C9-23 deficiente en adhesión, fagocitosis, virulencia y efecto citopático, seleccionada a partir de la clona C9 (HM1:IMSS), la cual es virulenta y resistente a emetina. (Rodríguez, 1985).

RESUMEN

El objetivo general de esta tesis fue estudiar la relación que existe entre la virulencia de los trofozoítos de Entamoeba histolytica y la adhesión, la fagocitosis, y la interacción de éstos con bacterias.

Con el objeto de obtener pruebas directas acerca de la relación entre la adhesión específica y la fagocitosis ambiana con la virulencia de los trofozoítos, se obtuvieron clones de E. histolytica deficientes en adhesión a eritrocitos humanos. Para tal fin, los trofozoítos de E. histolytica de la cepa HM1:IMSS se incubaron a 4°C con eritrocitos humanos durante 10 min y se pasaron a través de gradientes de ficoll para seleccionar los trofozoítos de menor densidad, los cuales correspondieron a aquellos que no adhirieron eritrocitos. Posteriormente, se obtuvieron clones en agar semisólido para caracterizar sus propiedades de virulencia, fagocitosis, adhesión, efecto citopático y citotóxico sobre células epiteliales en cultivo. El 20 % de las clones aisladas al azar, adhirieron menos del 50 % de eritrocitos humanos que la cepa silvestre. Estas clones se caracterizaron en su eficiencia de adhesión a diferentes tipos de células, en su velocidad de fagocitosis tanto de eritrocitos humanos como de esferas de látex, en la actividad de lectina de sus extractos y en su virulencia medida "in vivo". Las clones obtenidas por ser deficientes en adhesión a eritrocitos humanos, mostraron deficiencia: en

adhesión a células epiteliales, en fagocitosis, en su actividad de lectina y en virulencia, en comparación con la cepa silvestre (HMI:IMSS). Sin embargo, su velocidad para fagocitar esferas de látex fue semejante a la de la cepa silvestre o HMI:IMSS. Los resultados indican que la adhesión de E. histolytica a eritrocitos humanos es un evento específico mediado aparentemente por alguna lectina amibiana y que la deficiencia en adhesión a eritrocitos humanos correlaciona con la deficiencia en fagocitosis. Además, estos resultados también sugieren la presencia de receptores similares en los trofozoítos con afinidad por eritrocitos humanos y por células epiteliales de la línea MDCK, que participan en la adhesión amibiana.

El efecto de las bacterias Escherichia coli sobre diversas actividades biológicas de varias cepas de E. histolytica con diferente fenotipo de virulencia se estudió también en este trabajo. La incubación previa por tiempos cortos, aumentó notablemente la virulencia de aquellos, medida por inoculación intraportal de los trofozoítos en hámsteres jóvenes, la eritrofagocitosis, el efecto citopático y la actividad de toxina de los extractos amibianos, pero no la eficiencia de la adhesión. Para estudiar la especificidad de esta activación de las propiedades de virulencia amibiana por cierto tipo de bacterias, se probaron otro tipo de células blanco, como posible activador de la virulencia. La incubación previa de los trofozoítos con eritrocitos humanos, no aumentó el efecto

citopático ni el citotóxico. Por lo tanto, la activación de las propiedades de virulencia de los trofozoítos, fue específica de las bacterias probadas, ya que el contacto previo de los trofozoítos con los eritrocitos humanos, no produjo activación alguna.

Los resultados obtenidos, mostraron que el contacto específico entre las bacterias y los trofozoítos, es importante para producir el efecto de activación de la virulencia en las amibas y de varias propiedades biológicas relacionadas con ellas, tanto en los trofozoítos virulentos, como avirulentos y de virulencia atenuada.

INTRODUCCION

La amibiasis humana es una enfermedad infecciosa endémica, causada por el parásito Entamoeba histolytica. Este padecimiento puede o no tener manifestaciones clínicas (W. H. O., 1969).

Importancia y frecuencia de E. histolytica.

La amibiasis intestinal es un padecimiento que se presenta como una infección asintomática del colon, o bien como disentería amibiana aguda, la cual se caracteriza por intensa diarrea. Los trofozoítos de E. histolytica pueden permanecer en el intestino como comensales sin producir daño aparente, pero por razones desconocidas ocasionalmente invaden el revestimiento del intestino grueso de sus huéspedes ingiriendo células epiteliales y dañando el tejido probablemente mediante la producción de enzimas proteolíticas. En el interior de la pared intestinal, algunos de los trofozoítos pueden pasar al sistema circulatorio y ser capaces de invadir prácticamente cualquier epitelio. Las formas más comunes de la amibiasis invasora son la intestinal y la hepática, pero también se han reportado casos de amibiasis pulmonar (Wu y col., 1968), cutánea (Brandt y Pérez-Tamayo, 1956), en órganos genitales (García Sainz y col., 1971), en bazo y en riñón (Biagi, 1973), etc.

E. histolytica es el parásito responsable de una enfermedad grave, capaz de matar al enfermo que la sufre en

un período relativamente breve. También puede causar un padecimiento crónico que inutiliza a individuos productivos por períodos prolongados, con la consecuente repercusión económica (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970). Por otro lado, E. histolytica tiene amplia distribución geográfica, ya que la enfermedad que produce se presenta prácticamente en todo el mundo, ocurriendo más frecuentemente en las zonas tropicales y subtropicales. La incidencia de la infección es un problema aún mayor en regiones donde las condiciones sanitarias de salud son inadecuadas. Junto con la pobreza, la ignorancia y el hacinamiento, la presencia de cepas altamente virulentas, se combina con estos factores, para mantener una alta incidencia de amibiasis intestinal en niños y de abscesos hepáticos en adultos, generalmente hombres (Martínez-Palomo, 1982).

Numéricamente, se ha calculado que 400 millones de personas en el mundo albergan este parásito. De ellas, el 80% carece de síntomas agudos (Cheng, 1978).

En registros del Hospital General de México de la SSA, en 1968 se nota que la amibiasis ocupa el cuarto lugar como causa de muerte, (Riadura y López, 1968). En un estudio de mortalidad urbana por amibiasis, en los años de 1962 a 1964 en 10 ciudades de Hispanoamérica se encontró que, de 100 muertes por amibiasis, 33 ocurrieron en la ciudad de México, (Brandt, H. y Pérez-Tamayo, 1970).

Clasificación Taxonómica.

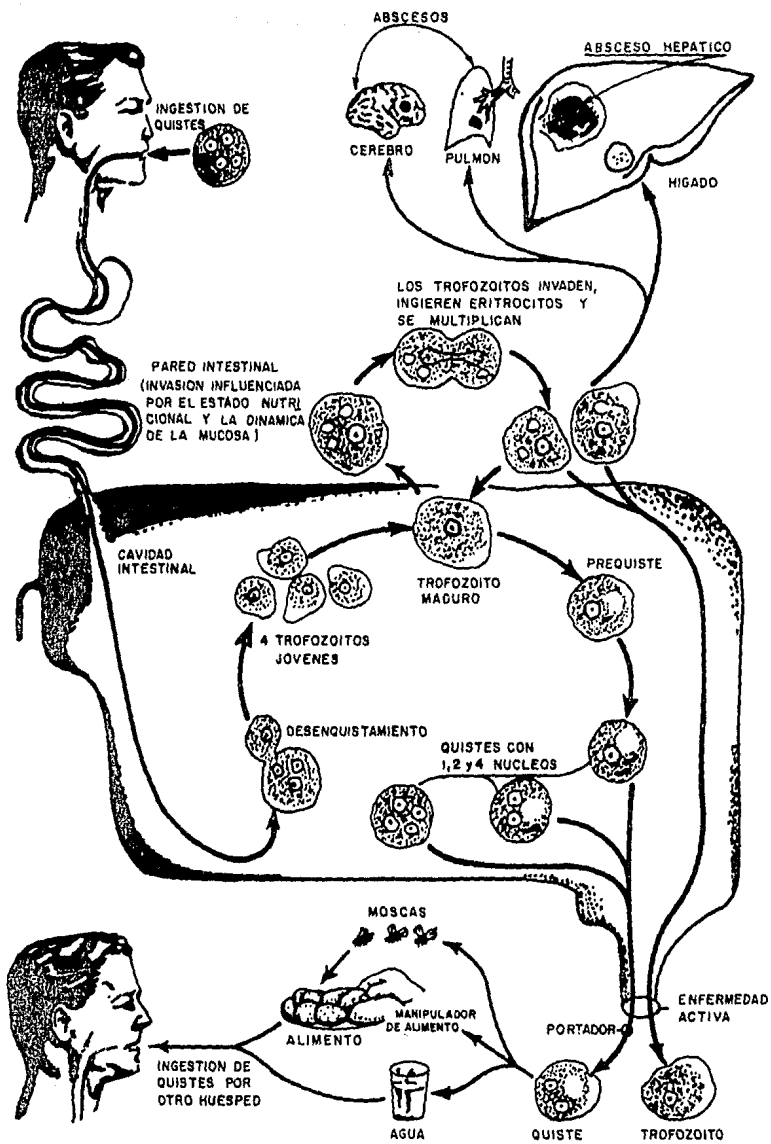
Los miembros del orden Amoebida son exclusivamente parásitos. El género Entamoeba incluye numerosas especies que parasitan a vertebrados e invertebrados. La especie mejor conocida que parasita al hombre, es E. histolytica y es el agente causal de la disentería amibiana.

La clasificación taxonómica del parásito, de acuerdo al Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoólogos, 1982, es la siguiente:

Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosea
Subclase	Gymnamoebia
Orden	Amoebida
Suborden	Tubulina
Género	<u>Entamoeba</u>
Especie	<u>E. histolytica</u>

Ciclo de vida.

El ciclo de vida de E. histolytica se encuentra resumido en el esquema siguiente, éste presenta dos fases, una trofozoítica y otra quística. Principia con el quiste, que es la forma infectiva, éste se adquiere al ingerir agua o alimentos contaminados, que al pasar por el estómago y, debido a cambios en el pH y a otros factores prácticamente desconocidos, inician el desenquistamiento.



ESQUEMA 1

Después de la ruptura de la pared quística, emerge un organismo tetranucleado que pasa por diferentes estadios metaquísticos, en los cuales el núcleo se divide para dar lugar a 8 núcleos. Posteriormente se presenta una división citoplásmica, que da origen a 8 trofozoítos (Martínez-Palomo, 1982). El trofozoíto uninucleado se adhiere a la mucosa intestinal y puede producir ulceración, provocando diarrea. Algunos trofozoítos son expulsados del tracto digestivo o pueden atravesar la pared intestinal e invadir los tejidos multiplicándose y produciendo daño, por lo que al trofozoíto se le conoce como la forma invasiva. Los trofozoítos se dividen una o varias veces y después enquistan en el mismo huésped. Se cree que los quistes no pueden desenquistar en el mismo huésped, sino que tienen que ser expulsados con las heces para empezar un nuevo ciclo (Martínez-Palomo, 1982).

a) Trofozoíto.

El trofozoíto es la forma móvil, mide de 7 a 40 μ de diámetro, es una célula dinámica y pleomórfica. Su forma es variable, generalmente elongada con formación de lobopodos que son proyecciones temporales de la superficie que participan en la locomoción y en la alimentación. Presenta una región uroide que se encuentra en el extremo posterior y parece ser la región de mayor adhesividad. La forma y movilidad del trofozoíto, son extremadamente sensibles a cambios del medio, como la temperatura, las variaciones en el pH, la osmolaridad y el potencial redox, entre otros, (Martínez-Palomo, 1982).

El citoplasma del trofozoíto está bien diferenciado en ectoplasma hialino y endoplasma granuloso. El ectoplasma aparece como una región de material fibrogranular de menor densidad electrónica que el endoplasma. Este último contiene un sistema vacuolar formado por una población heterogénea de vesículas y vacuolas. El trofozoíto carece de algunos de los organelos típicos de células eucariontes como son las mitocondrias, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico rugoso y los peroxisomas. El trofozoíto presenta de 1 a 2 núcleos con cromatina periférica y nucleolo central (Martínez-Palomo, 1982). Los trofozoítos tradicionalmente se han considerado como anaerobios por la carencia de mitocondrias, citocromos y ciclo tricarbóxico funcional. Sin embargo, se ha demostrado que son capaces de consumir oxígeno, (Weinbach y col., 1978). También se ha descrito en los trofozoítos de E. histolytica la existencia de retículo membranoso compuesto de finos túbulos, el cual se ha interpretado como la contraparte del retículo endoplásmico típico (Ludvik y Shipstone, 1970).

b) Quiste.

El quiste es una estructura redonda u oval, que mide 12 μm de diámetro y que contiene de 1 a 4 núcleos, dependiendo del estadio de madurez en que se encuentre, los núcleos son semejantes al núcleo del trofozoíto (Smith y col., 1979). El núcleo está recubierto por una pared de 0.5 μm de espesor que consiste de una malla fibrilar compacta. También se ha

observado en él una vacuola de glucógeno, aunque en los estadios iniciales del enquistamiento son abundantes los agregados de glucógeno, (Chávez y col., 1978). El quiste presenta un endosoma pequeño central o excéntrico, además, se localizan en él, cuerpos cromatoides de formas variadas, en los que se observa cromatina periférica, (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970). El quiste es resistente a las condiciones adversas del medio y puede vivir fuera del huésped por semanas o meses (Noble y Noble, 1976).

Patogenicidad de E. histolytica.

La patogenicidad se define como la capacidad de los microorganismos para causar daño, mientras que la virulencia es un grado de la patogenicidad que se refiere a la mayor o menor capacidad del microorganismo para producir la enfermedad. Debido a que E. histolytica es una especie patógena, es importante conocer cuales son los factores que participan para que las cepas amibianas presenten mayor o menor grado de virulencia y cuales son los factores que intervienen para que los trofozoítos sean capaces de invadir tejidos. Se han planteado diferentes hipótesis que intentan explicar la mayor o menor capacidad invasiva del parásito y el por qué esta característica está restringida a cepas amibianas de ciertas regiones geográficas. Entre estas hipótesis, las tres más importantes son:

a) Unicista.

La teoría unicista propuesta por Dobell desde 1919, establece que E. histolytica es una especie parásita la cual siempre es capaz de producir ulceraciones intestinales. Esto implica que la enfermedad se produce cuando el hospedero es infectado con trofozoítos altamente virulentos o cuando se infecta con trofozoítos poco virulentos, pero el hospedero tiene deficiencias en su resistencia a la infección.

b) Dualista.

Esta teoría propuesta por Brumpt en 1949, propone que E. histolytica está formada realmente por 2 especies diferentes de amibas, una patógena llamada Entamoeba dysenteriae y la otra no patógena llamada Entamoeba dispar. Sin embargo, todas las cepas de E. histolytica son morfológica, bioquímica e inmunológicamente similares y no existen datos suficientes para clasificar a las diferentes cepas en especies diferentes.

c) Pluralista.

La teoría pluralista establece que E. histolytica está compuesta de cepas de diferente virulencia. Según esta hipótesis, algunos trofozoítos actúan como comensales en el lumen del intestino, sin causar daño aparente. Existen otros trofozoítos que sólo bajo ciertas circunstancias pueden causar invasión de tejidos, como es el caso del absceso hepático. Algunos más, son incapaces de causar daño tisular.

Todas estas teorías tienen contradicciones. En el caso de la unicista, los experimentos de Orozco y col., (1983), la contradicen, al encontrar que algunas clonas amebianas aisladas de cepas de E. histolytica altamente virulentas fueron incapaces de producir abscesos en animales de experimentación aún cuando se inoculó un número tan alto como 3×10^6 trofozoítos por animal. La teoría dualista tiene la contradicción de que todas las cepas de E. histolytica aisladas hasta la fecha, son similares y no se han encontrado marcadores apropiados para distinguirlas y que permitan diferenciar las especies. En la teoría pluralista se reconoce ampliamente la existencia de cepas de E. histolytica con diferencias en la virulencia, pero no hay suficientes evidencias para clasificarlas en especies diferentes. Esta teoría es la más aceptada actualmente.

Mecanismo de agresión de E. histolytica.

El mecanismo de agresión de la ameba, es prácticamente desconocido. Sin embargo, existen varias hipótesis para explicarlo. Se han propuesto al menos dos formas por medio de las cuales la ameba lleve a cabo su mecanismo de agresión:

- a) A distancia por medio de la liberación de sustancias tóxicas difusibles (Chevez y col., 1972) y
- b) Por contacto.

Algunos autores como Griffin y Juniper (1972), Takeuchi y Phillips (1975), consideran que el mecanismo de agresión

de la amiba, se lleva a cabo por medio de liberación de sustancias líticas que actúan no sólo sobre las células epiteliales, sino también sobre los leucocitos. Estos a su vez, liberan enzimas hidrolíticas que ayudan a producir el daño celular.

Otros autores han reportado actividad fibrinolítica (Chevez y col., 1971), de fosfatasa ácida y alcalina (Lee y col., 1971) y actividad de colagenasa (Muñoz y col., 1980), en cepas patógenas de E. histolytica. Sin embargo, no existen evidencias claras que demuestren que estas actividades enzimáticas están involucradas en la patogenicidad de E. histolytica.

La mayoría de los autores coinciden en que el daño que produce el trofozoíto a la célula blanco, es dependiente de contacto. Eaton y col., (1969, 1970), describieron un "lisosoma activo de superficie" el cual actuaría, según ellos, en el momento del contacto entre el trofozoíto y la célula blanco. Sin embargo, Deas y Miller (1977) y Orozco (1978) no encontraron este lisosoma, sino vacuolas cerca de la membrana plasmática, en las zonas de contacto con la célula blanco. Knight y col., (1975), concluyeron que el efecto citopático de la amiba es dependiente del contacto entre la amiba y las superficies celulares, Jarumilinta y Kradolfer (1964), Artigas y col., (1966) y Ravdin y Guerrant (1980) observaron desgranulación y lisis de leucocitos sólo al entrar en contacto con los trofozoítos de E. histolytica.

Los estudios ultraestructurales de Orozco (1978) y cinematográficos de Cervantes (1980) sobre la citopatogenicidad de E. histolytica sobre hepatocitos de rata adulta en cultivo y células epiteliales de la línea MDCK, sugirieron que el mecanismo de agresión de la amiba se lleva a cabo en tres etapas sucesivas que son:

- a) La adhesión, en la que las membranas plasmáticas del trofozoíto y de la célula blanco entran en contacto, este evento parece ser el primero en el efecto citopático.
- b) El daño celular, en que las células que están en contacto con el trofozoíto, se redondean, se desprenden del sustrato y aparecen ampollas en la membrana plasmática, indicando pérdida de continuidad de la membrana y
- c) La fagocitosis que se produce después del daño celular, ya que todas las células que las amibas fagocitaron, aparecieron con daño incipiente o generalizado.

Factores que participan en el establecimiento de la infección por E. histolytica.

La virulencia de E. histolytica es un fenómeno multifactorial que depende de la combinación de varios factores como son:

- a) Propios del parásito.
- b) Del medio ambiente, y
- c) Del huésped.

a) Factores del parásito.

Estos se refieren a caracteres morfológicos, bioquímicos y fisiológicos de las amibas, son los aspectos más estudiados. Existen cepas amibianas con diferente virulencia, la cual heredan a sus descendientes. Esta característica es estable en las cepas en cultivo (Orozco, 1981).

b) Factores del medio.

La virulencia de las cepas patógenas de E. histolytica puede variar con las siguientes condiciones de cultivo:

- 1) La asociación con determinadas bacterias aumentan su virulencia (Wittner y Rosebaum, 1970, Phillips y col., 1972, Bos y Hage, 1975).
- 2) El número de subcultivos hace que algunas cepas amibianas pierdan su virulencia y al axenizarlas también se disminuye ésta (Diamond y col., 1974; Gharidian y Meerovitch, 1979).
- 3) Los trofozoítos de E. histolytica aumentan su virulencia al ser inoculados en animales y luego recultivados (Lushbaugh y col., 1978).
- 4) La adición de colesterol al medio de cultivo incrementa la virulencia (Meerovith y Gharidian, 1978).

c) Factores del huésped.

Estos factores son los menos estudiados. Brandt y Pérez-Tamayo (1970), indican que estos pueden ser:

- 1) Genéticos: Son los que determinan que algunos individuos sean más susceptibles que otros.
- 2) Nutricionales: Las dietas bajas en proteínas y altas en carbohidratos y colesterol, favorecen la infección amibiana.
- 3) Hormonales: Los niveles altos de prostaglandinas, favorecen la infección por amibas (Das y col., 1979).
- 4) Stress: También se ha reportado como un factor que hace al individuo más susceptible a la infección amibiana.

Sin embargo, no se han encontrado evidencias suficientes que proporcionen datos que ayuden a entender como influyen estos factores en la virulencia amibiana.

Citopatogenicidad de E. histolytica.

Hasta la fecha no se han descrito las moléculas responsables de la citopatogenicidad de E. histolytica, a pesar de la gran cantidad de estudios morfológicos, bioquímicos e inmunológicos realizados. El conocimiento de la virulencia amibiana se facilitó a partir de 1978 debido a que, por primera vez, los trofozoítos de E. histolytica se lograron cultivar axénicamente, gracias al establecimiento del medio TYI-S-33, (Diamond y col., 1978). Otro de los logros recientes que han contribuido al estudio comparativo de cepas patógenas y no patógenas, es el aislamiento y cultivo en el laboratorio de cepas no patógenas de E. histolytica. Orozco

y col. (1983, 1986) obtuvieron trofozoítos deficientes en virulencia, aislados directamente de cepas virulentas (esta tesis) o inducidos por medio de mutagénesis química (Rodríguez y Orozco, 1986). Utilizando estas clonas, se ha logrado establecer la importancia de la fagocitosis y adhesión en la virulencia amibiana. Esto está haciendo posible definir además, la importancia de otros factores involucrados en la citopatogenicidad del parásito, como son el efecto citopático y citotóxico (Orozco y col., 1986).

En estudios realizados en diferentes cepas amibianas se ha encontrado que ciertas propiedades biológicas de los trofozoítos como el grado de eritrofagocitosis, la carga eléctrica de superficie, la aglutinación con concanavalina A y el efecto citopático "in vivo", son diferentes en las distintas cepas de E. histolytica (Trissl y col., 1977, 1978 y Orozco y col., 1980). Algunas de estas propiedades están directamente relacionadas con la virulencia de las cepas amibianas y se discutirán posteriormente.

a) Formación de colonias en agar semisólido.

Gillin y Diamond (1978), sugirieron que la eficiencia para formar colonias en agar semisólido, correlaciona con la virulencia de las cepas. Orozco y col., (1982a), encontraron que una clona deficiente en fagocitosis y en virulencia, presentaba deficiencia para formar colonias en agar semisólido. Sin embargo, revertantes en virulencia de

la misma clona, no recobraron la capacidad de crecer en agar semisólido (Orozco y col., 1983). Suárez (1983) aisló clonas deficientes en fagocitosis y en virulencia, las cuales fueron capaces de crecer en agar semisólido, aunque con menor eficiencia que la cepa silvestre. Estos resultados fueron confirmados por Rodríguez (1985). Por tanto, no se puede afirmar que la eficiencia de formación de colonias en agar semisólido esté relacionada con la virulencia.

b) Evasión de la respuesta inmune.

La capacidad de E. histolytica para evadir la respuesta inmune, es otra propiedad relacionada con la virulencia. Los trofozoítos son capaces de llevar a cabo la eliminación de los anticuerpos anti-amiba por medio de la formación de casquete y la posterior eliminación de éste, el cual incluye los complejos antígeno-anticuerpo, liberándose así de una de las formas de ataque del hospedero (Aust-Kettis y Sundqvist, 1978, Calderón y col., 1980). La resistencia de los trofozoítos a la acción lítica del complemento, también ha sido descrita como un factor que ayuda a la sobrevivencia de los trofozoítos en el huésped, (Calderón y Tovar-Gallegos, 1980; Reed y col., 1983). Así mismo, la resistencia de los trofozoítos a la acción de los neutrofilos, puede considerarse como otro medio de evasión de la respuesta inmune (Tsutsumi y col., 1984; Ravdin y col., 1985).

c) Importancia de la superficie celular de E. histolytica.

Los estudios de adhesión sugieren que la superficie celular, tanto del huésped como del parásito juegan un papel fundamental en la virulencia, por lo que el estudio de la superficie de los trofozoítos permitirá entender el mecanismo de agresión de éstos y conocer los factores que determinan la expresión del diferente grado de virulencia de E. histolytica. El entendimiento de las interacciones ligando-receptor, depende del conocimiento de la estructura básica de la membrana. La fluidez de la membrana-plasmática, parece esencial para las interacciones entre las estructuras proteínicas como un paso obligado para su función. Las proteínas pueden tener una distribución no ordenada o formar agregados en la membrana, además pueden sufrir movilización lateral, la redistribución de las moléculas superficiales puede llevarse a cabo por difusión lateral pasiva altamente dependiente de la temperatura y formar agregados en un polo de la membrana celular.

Algunas de las propiedades de superficie de los trofozoítos de E. histolytica, están relacionadas con la virulencia y es obvio que algunas de ellas participan en la adhesión, fagocitosis y efecto citopático. La citopatogenicidad amibiana está relacionada con la ausencia de carga repulsiva en la superficie celular, lo cual fue demostrado por Trissl y col., (1977), al encontrar que las cepas no patógenas presentan una carga eléctrica de superficie negativa,

mientras que las cepas patógenas tienen una carga eléctrica de superficie, tan baja, que no se detecta.

d) Actividades de lectina.

Las lectinas son proteínas que tienen la capacidad de unirse a carbohidratos. Por medio de esta propiedad aglutinan a las células y/o precipitan carbohidratos complejos. Se descubrieron en plantas, pero ya se han encontrado en muchos otros seres vivos.

La presencia de lectinas en los trofozoítos de E. histolytica se propuso recientemente y se ha sugerido que tienen un papel en la unión del parásito a la célula blanco. Las actividades de lectina, se encontraron realizando experimentos de hemaglutinación de eritrocitos humanos, (Kobiler y Mirelman, 1980) y de células de ovario de hámster chino (Ravdin y Guerrant, 1981). Estas actividades se encontraron asociadas a la fracción membranal y una de ellas es sensible a la inhibición por polímeros de N-acetilglucosamina (Kobiler y Mirelman, 1981). Otra, la reportada por Ravdin y col., (1985), es sensible a N-acetilgalactosamina. Además, se encontró una relación directa entre el grado de inhibición de la adhesión por N-acetil galactosamina y el grado de la virulencia de los trofozoítos (Ravdin y col., 1985). Es probable que las proteínas responsables de esta actividad de lectina, estén involucradas en los procesos de adhesión de la amiba a la célula blanco.

Otra propiedad de superficie relacionada con la virulencia amibiana, es la capacidad de los trofozoítos para aglutinar con concanavalina A. Esta aglutinación, se debe a la presencia de gluco y manoproteínas en la membrana de la amiba. Esta propiedad fue descrita en cepas virulentas por Trissl y col., (1977). Posteriormente, el estudio de tres cepas de diferente virulencia, mostró que las tres cepas aglutinan igual con concanavalina A (Orozco, 1981). Por tanto, no existe correlación entre esta propiedad y la virulencia de las cepas.

La mayoría de los datos anteriores, parecen indicar que existe una relación directa entre algunas propiedades de la superficie, la adhesión y la virulencia amibiana. Sin embargo, aunque la adhesión es un evento necesario para que se produzca la infección y posterior invasión, no es la única propiedad causante de la agresividad amibiana.

e) Adhesión.

La adherencia de los microorganismos patógenos a la superficie de las células de los órganos que invaden, es uno de los factores necesarios para su virulencia. Mediante este mecanismo, los gérmenes pueden establecerse, mantenerse, reproducirse en los tejidos, resistir las defensas normales del huésped y tener la posibilidad de invadirlos (Jones, 1977; Smith, 1977).

La adherencia de R. histolytica, al igual que la de:

otros microorganismos patógenos, es importante en la invasión tisular. Como ya se mencionó anteriormente, la adhesión del trofozoíto a la célula blanco, es uno de los primeros pasos en el mecanismo de agresión de la amiba. Existen estudios tanto "in vitro" como "in vivo" de este fenómeno, que apoyan su participación en la virulencia amibiana. Takeuchi y Phillips (1975), notaron adherencia de amibas al epitelio colónico antes de la penetración al epitelio interglandular, lo cual más tarde fue confirmado por Knight y col., (1975). Mora-Galindo y col., (1978), Orozco y col. (1982a), Tsutsumi y col., (1984) y Chadee y Meeroovitch (1984, 1985), quienes demostraron que los trofozoítos se adhieren a las células inflamatorias, utilizando modelos de estudio "in vivo" como la producción de abscesos hepáticos amibianos en animales e invasión colónica, la adherencia precedió siempre la invasión del colon a la lisis de las células hepáticas. Por lo tanto, la adhesión es un evento especialmente importante en el proceso invasivo de la amiba, tanto "in vivo" como "in vitro" y precede a la destrucción celular. Sin embargo, a pesar de los estudios "in vivo" e "in vitro" realizados hasta la fecha, los factores moleculares que participan en la adherencia amibiana al epitelio colónico previo a la invasión, no se han dilucidado.

Los trofozoítos de E. histolytica se adhieren a eritrocitos, a bacterias y a células epiteliales como un paso necesario en el proceso de alimentación y probablemente como

un paso en el mecanismo de agresión de las cepas patógenas. Las amibas parecen tener mayor afinidad para adherir eritrocitos humanos y de hámster, que para adherir eritrocitos de conejo, cuyo y rata, (Olguín, 1984), vaca o borrego, (Ravdin y Guerrant, 1981), lo que sugiere la presencia de receptores específicos en la superficie celular, que median la adhesión a la célula blanco. Estos últimos autores también probaron que E. histolytica se adhiere a células de ovario de hámster chino (CHO) y que esta adhesión es bloqueada por citocalasina, lo que implica la participación de los microfilamentos.

f) Fagocitosis.

Los trofozoítos de E. histolytica ingieren una gran variedad de partículas como granos de almidón, bacterias, protozoarios, esferas de látex, glóbulos rojos, etc., como un mecanismo para alimentarse. La fagocitosis también es una forma de agresión del parásito (Lushbaugh y col., 1976; Chevez y col., 1975). El proceso de la fagocitosis se lleva a cabo por medio de 2 mecanismos que parecen ser diferentes:

- 1) Fagocitosis específica. Es aquella que se lleva a cabo por medio de receptores específicos que se encuentran sobre la superficie del trofozoíto o de la célula blanco. Como un ejemplo de este tipo de fagocitosis, es la ingestión de varias especies de células de mamífero y de diversas especies de bacterias. En este mecanismo específico la adhesión a la célula blanco es un evento

importante y fundamental que debe proceder a la ingestión de las partículas. Si la adhesión específica se bloquea, la fagocitosis específica no se lleva a cabo.

- 2) Fagocitosis no específica. Es un mecanismo físico que está mediado por fuerzas electrostáticas en el cual no participan receptores específicos. Como ejemplo de este tipo de fagocitosis, es la ingestión de granos de almidón y partículas de látex.

La fagocitosis es una propiedad biológica de los trofozoítos relacionada con la virulencia de las cepas. La ingestión de eritrocitos humanos es uno de los criterios que se han utilizado tradicionalmente para reconocer a los trofozoítos de E. histolytica en las lesiones que produce en los tejidos del organismo humano y se le ha relacionado con la virulencia del microorganismo (Chevez y col., 1974; Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1980). La prueba más directa de que la fagocitosis participa en la virulencia de la amiba, se obtuvo por medio del aislamiento de trofozoítos avirulentos a partir de una clona de E. histolytica virulenta. Estos trofozoítos corresponden a una cepa también altamente fagocítica que, al volverse avirulentos, perdieron su alta capacidad de fagocitosis. Al revertir la virulencia, los trofozoítos también revirtieron su capacidad eritrofágica, trofozoítos ahora altamente virulentos fueron eficientes en fagocitosis (Orozco y col., 1983). Por otra parte, Suárez (1983) aisló clonas mutantes en fagocitosis por medio de la selección con bacterias envenenadas con bromodesoxiuridina.

De las clonas deficientes en fagocitosis, algunas también lo fueron en adhesión. Además, todas las clonas presentaron incapacidad para colonizar el hígado de hámster y producir abscesos hepáticos. Rodríguez (1985), aisló 10 mutantes amibianos deficientes en fagocitosis, marcadas genéticamente con resistencia a emetina y encontró también que todas las mutantes presentaron disminución en su virulencia. Tres de ellas, mostraron deficiencia para adherir eritrocitos humanos (Rodríguez y Orozco, 1986). Estos resultados ponen de manifiesto que la fagocitosis es un fenómeno altamente complejo, en el que participan varios factores. Estas mutantes y clonas deficientes en fagocitosis, obtenidas independientemente, serán de gran utilidad para definir cuáles son estos factores.

La eficiencia de fagocitosis se ve afectada por la temperatura, la virulencia de la cepa, la fase de crecimiento de los cultivos, la fase del ciclo celular, la acidez del medio, la concentración de calcio, la presencia de azúcares en el medio, como son la N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina, entre otros.

g) Efecto citopático y citotóxico.

El efecto citopático, definido como la capacidad de los trofozoítos para destruir monocapas en cultivo y la "actividad citotóxica", definida como la capacidad de los extractos amibianos libres de células para destruir también

monocapas en cultivo, correlacionan también con el grado de virulencia de las diferentes cepas de E. histolytica. Los ensayos para medir el efecto citopático y citotóxico de la amiba, requieren el uso de monocapas en cultivo de células de mamífero. Se han utilizado diferentes tipos de células, como las de ovario de hámster chino (Ravdin y col., 1980), de riñón de conejo (Knight, 1977), así como de la línea MDCK (Orozco y col., 1978).

El efecto citopático se produce después del contacto directo de los trofozoítos con la monocapa celular. El mecanismo de acción es aparentemente el siguiente: primero ocurre una disminución pronunciada de la resistencia eléctrica transepitelial (Orozco y col., 1982c; Martínez-Palomo y col., 1985), seguida por la ruptura de las uniones herméticas, entre las células. Posteriormente, hay redondeamiento de las células de la monocapa, con el consecuente desprendimiento del sustrato, finalmente, se produce lisis y fagocitosis de las células por los trofozoítos.

Mattern y col., (1978) y Orozco y col., (1978), fueron los primeros en probar que el grado de destrucción de la monocapa correspondía con el grado de virulencia. Posteriormente, Orozco y col., (1980), estudiaron varias propiedades de superficie, entre ellas el efecto citopático de tres cepas de diferente virulencia y encontraron una correlación directa entre el grado de destrucción de la

monocapa celular, la fagocitosis y el grado de virulencia.

Bos (1979), Lushbaugh y col., (1979) y Mattern y col., (1980), reportaron actividad tóxica de extractos amibianos sobre células de mamífero en cultivo. La "actividad tóxica" de los trofozoítos, se encontró en una fracción con un peso molecular entre 35 y 45 Kilodaltones, la cual es degradable por tripsina y parece ser una glicoproteína, ya que es capaz de unirse a concanavalina A, (Bos y Van der Eijk, 1980). El proceso del efecto citotóxico es el siguiente: caída de la resistencia eléctrica transepitelial, rompimiento de las uniones intercelulares, desprendimiento de las células y formación de burbujas en la membrana de éstas (Orozco y col., 1982c, Martínez-Palomo y col., 1985). La actividad de los extractos amibianos, semeja al daño que producen los trofozoítos vivos sobre las monocapas celulares en cultivo (Lushbaugh y col., 1979).

Actualmente se ha demostrado que mutantes avirulentas tienen "actividad citotóxica" similar a la de la cepa silvestre virulenta, (Rodríguez y Orozco, 1986), por lo que el efecto citotóxico aunque probablemente participa en el daño celular, no es suficiente para que se exprese la virulencia. Existe, además, el reporte de otras actividades líticas de los extractos amibianos como la hemolisina, aunque el papel que juega ésta en la agresividad del parásito no se conoce aún (Said-Fernández y López-Revilla 1983).

Otras actividades enzimáticas de E. histolytica, relacionadas con su virulencia.

h) Actividad de collagenasa.

Muñoz y col., (1982 y 1984), reportaron la presencia de una enzima que digiere colagena, la cual tiene marcada preferencia por la colagena del tipo I. Esta enzima aparentemente se encuentra en la membrana del trofozoíto y es necesario el contacto directo del trofozoíto con la colagena, para que se presente la actividad de collagenasa. También se demostró que existe una relación con la virulencia, ya que las cepas más virulentas presentaron mayor actividad de collagenasa.

i) Actividad mitogénica.

Se ha reportado también una actividad mitogénica en los extractos amibianos sobre linfocitos humanos (Diamantstein y col., 1981).

Salata y Ravdin (1985), encontraron que el efecto mitogénico de los extractos amibianos, es inhibido por asialofetuina. La asialofetuina tiene tres residuos de N-acetilgalactosamina, lo que sugiere que la actividad mitogénica está mediada por una proteína que se une al azúcar. La inhibición de este efecto correlaciona tanto con la presencia de la lectina inhibida por N-acetilgalactosamina como con la virulencia de las cepas estudiadas (Salata y

Ravdin, 1985). Sin embargo, no se conoce si la misma molécula es responsable de la actividad mitogénica y de lectina.

j) Actividad formadora de canales.

Se ha descrito también una proteína sobre la membrana de E. histolytica, que es capaz de formar poros en la membrana de macrófagos y linfocitos (Young y col., 1982). A esta proteína se le ha llamado amebaporo y es capaz de incorporarse espontáneamente en las membranas de la célula huésped. Esta proteína induce una rápida despolarización en la membrana de las células mencionadas, la cual las conduce a un estado prelítico. El amebaporo está presente dentro de la amiba y es desprendido al medio por un proceso mediado por estímulos. Esta liberación es aumentada por la adición de concanavalina A, lipopolisacáridos o el ionoforo de calcio A 23187 (Gitler y col., 1984). El papel de tal proteína en la virulencia, no se conoce aún.

k) Efecto de la asociación de los trofozoítos con bacterias en la virulencia amibiana.

Westphal (1937); Phillips y col., (1955), fueron los primeros autores en demostrar que la virulencia de las amibas aumentaba al asociarse con varias especies de bacterias, lo cual se evidenciaba por una mayor capacidad de los trofozoítos para producir abscesos hepáticos en hámsteres. Bos y Hage (1975), reportaron que la separación de la flora intestinal

asociada inducía en las cepas amibianas una rápida disminución en la virulencia, en un período de semanas o meses, mientras que al reasociarse con bacterias, se readquiría la citopatogenicidad. Wittner y Rosenbaum (1970), encontraron que E. histolytica tenía que ser asociada con bacterias vivas no patógenas, por un lapso mayor de 6 h, para llegar a producir lesiones en el hígado, mientras que los extractos de bacterias o las bacterias muertas, no tenían efecto. Estas observaciones sugirieron la hipótesis de que la virulencia amibiana podía depender de un factor parecido a un episoma, el cual requeriría el contacto directo con bacterias para ser expresado.

Bracha y col., (1982), demostraron que E. histolytica es muy selectiva en sus interacciones con bacterias y describieron 2 mecanismos responsables para la unión de bacterias a los trofozoítos:

- 1) Los trofozoítos se adhieren a bacterias del tipo Escherichia coli y Serratia marcescens, debido a que éstas poseen componentes de manosa sobre su superficie celular y son unidos por receptores de manosa que se encuentran en la membrana amibiana.
- 2) Los trofozoítos también se unen a otras especies de bacterias como Shigella flexneri y Staphylococcus aureus, que carecen de manosa en su superficie, sólomente si se recubren con concanavalina A o después de su opsonización.

En el primer caso, las bacterias se unen directamente a la amiba por medio de los azúcares del tipo manosa y glucosa que poseen; en el segundo caso, la unión es por medio de carbohidratos específicos que se encuentran en las cadenas de los anticuerpos que recubren a las bacterias, tales como galactosa y N-acetilgalactosamina. Esta adhesión es marcadamente inhibida por N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina (Bracha y col., 1982).

Posteriormente, Bracha y Mirelman (1983), demuestran que los trofozoítos de E. histolytica también pueden adherir cierto tipo de bacterias que carecen de manosa y no son opsonizadas. Esta adhesión está mediada por la presencia de ciertos azúcares sobre bacterias del tipo Escherichia coli serotipo 055 y Salmonella greenside 050 y la lectina de los trofozoítos inhibible por carbohidratos de bajo peso molecular, tal como la galactosa, lactosa, N-acetilgalactosamina, asialofetuina y los extractos polisacáridos de E. coli 055. Esto es apoyado por el hecho de que la oxidación con peryodato de las bacterias impiden su adherencia, lo que implica, de acuerdo a estos autores, la participación de carbohidratos en la adhesión.

Bracha y Mirelman (1984), reportan que la asociación de los trofozoítos de E. histolytica con bacterias del tipo gram negativo, por períodos cortos incrementan su virulencia y que bacterias inactivadas, fijadas con glutaraldehído, sonicadas o tratadas con inhibidores de síntesis de

proteínas, no tienen propiedades activadoras en la virulencia de los trofozoítos. Otro hallazgo indica que la virulencia amibiana aumenta cuando los trofozoítos se incuban en condiciones microaeróbicas, por lo que sugieren que el potencial oxido-reducción es clave en la expresión de la virulencia, ya que las condiciones microaeróbicas, como la asociación con bacterias, parecen estimular el sistema de transporte de electrones en E. histolytica. Sin embargo, es necesario hacer mayores estudios, para conocer los factores tanto de la bacteria como de los trofozoítos que participan en este proceso de activación de la virulencia amibiana.

1) Heterogeneidad.

Los cambios en la virulencia observados en E. histolytica, son parcialmente explicados por la heterogeneidad de las cepas amibianas, haciendo que las propiedades de una cepa dada, dependan del equilibrio mantenido por las subpoblaciones de los trofozoítos. Los factores que intervienen en la variabilidad de las cepas, no se conocen completamente, pero se sabe que las cepas de E. histolytica están compuestas de trofozoítos que en una cepa determinada muestran diferencias en agresividad (Suárez, 1983). Algunas veces la expresión de la patogenicidad de ciertas cepas, requiere de la asociación con bacterias o de varios pasos a través del hígado de roedores para incrementar la virulencia amibiana (Phillips y col., 1955; Bos y Hage 1975; Lushbaugh y col., 1978b); estos factores pueden ejercer una fuerte presión para seleccionar

a las amibas más virulentas de una cepa heterogénea.

En el laboratorio se aislaron a partir de HMI:IMSS varias clonas en agar semisólido, las cuales fueron probadas después del subcultivo en medio líquido. Otras clonas se aislaron de una población previamente seleccionada, en la cual los trofozoítos altamente fagocíticos, se eliminaron por irradiación después de la incorporación de bromodecoxiuridina en su DNA, a través de la fagocitosis de bacterias marcadas (Orozco y col., 1983). Los resultados de estos experimentos mostraron la presencia de trofozoítos con tres grados diferentes de velocidades de fagocitosis, poniendo en evidencia la heterogeneidad de la cepa HMI:IMSS. Algunas de las clonas carentes en fagocitosis, presentaron deficiencia en la adhesión a eritrocitos, mientras otras clonas fueron incapaces de internalizar las partículas. En todos los casos, el grado de fagocitosis correlacionó con la virulencia de las clonas. Estas diferencias en las clonas han sido mantenidas por varios años en cultivos axénicos (Suárez, 1983; Orozco y col., 1985). De acuerdo a estos resultados, el establecimiento de líneas amibianas homogéneas es importante en estudios para la identificación de factores en cepas de E. histolytica que ayudan a diferenciar trofozoítos virulentos y no virulentos.

Como se ha mencionado anteriormente, la virulencia de E. histolytica es un fenómeno complejo en el cual participan varias propiedades y actividades biológicas. Algunas de éstas se han correlacionado directamente con la virulencia,

entre ellas la eficiencia para formar colonias en agar semisólido (Gillin y Diamond, 1978), la fagocitosis (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1982a, 1983; Suárez, 1983), la actividad de lectina sobre eritrocitos humanos (Kobiler y Mirelman, 1980), el efecto citopático sobre células en cultivo (Mattern y col., 1978; Orozco y col., 1980), la acción citotóxica de los extractos amibianos sobre células en cultivo (Lushbaugh y col., 1978a), el efecto mitogénico de los extractos amibianos sobre linfocitos humanos (Diamantstein y col., 1981; Salata y Ravdin, 1985), actividades enzimáticas como la de la colagenasa (Muñoz y col., 1984) y la capacidad para formar canales (Young y col., 1982; Gitler y col., 1984), entre otras. Sin embargo, no se ha definido con claridad si estas propiedades y actividades tienen un papel importante en la virulencia o si sólo están ligadas a factores que no tienen una relación directa con ella.

Una forma de saber cuáles de estos factores participan en la virulencia amibiana y cuáles sólo presentan una correlación coincidental, es emplear una estrategia genética que comprenda el aislamiento de clones de E. histolytica deficientes en características amibianas relacionadas con la virulencia.

La adhesión y la fagocitosis son eventos especialmente importantes en el proceso invasivo de la amiba tanto "in vivo" como "in vitro". Otro factor de virulencia es el

efecto activador de las bacterias sobre la agresividad de los trofozoítos, el cual ha sido muy poco estudiado. Por lo tanto, en este trabajo estudiamos el papel de la adhesión y de la fagocitosis de E. histolytica en la virulencia amibiana, así como el papel que juegan las bacterias en este fenómeno.

OBJETIVOS

- 1) Obtención de clones de E. histolytica con deficiencia en adhesión a eritrocitos humanos.

- 2) Caracterización de las mutantes deficientes en adhesión a eritrocitos, en algunas propiedades que se han relacionado con la virulencia amibiana, como son la capacidad para formar colonias en agar semisólido, la fagocitosis, la actividad de lectina, la adhesión y el efecto citopático sobre células epiteliales en cultivo.

- 3) Caracterización de la virulencia de las mutantes obtenidas.

- 4) Estudio del efecto de las bacterias sobre la virulencia, la adhesión, la fagocitosis, el efecto citopático y citotóxico de varias cepas y clones de E. histolytica con diferente virulencia.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de Entamoeba histolytica.

Los trofozoítos de la cepa HMI:IMSS y de las clonas obtenidas en el presente trabajo, se cultivaron axénicamente a 37°C, de acuerdo a la técnica de Diamond y Col., (1978) en medio TYI-S-33 con 16% de suero bovino inactivado (Biofluids), 3% de la mezcla de vitaminas de Diamond (North American Biologicals, U.S.A.), 25 U/ml de penicilina y 75 µg/ml de estreptomycin (TYI-S-33c). Para los experimentos realizados en este trabajo, los trofozoítos se cosecharon en fase logarítmica de crecimiento en tubos de 16 X 125 mm con tapa de rosca, conteniendo 12 ml de medio TYI-S-33c. Para cosechar las amibas, los tubos se enfriaron en un baño de agua-hielo a 0°C durante 10 min para despegarlas de las paredes del tubo y se concentraron por centrifugación a 360 X g durante 7 min. Los trofozoítos se contaron en un microscopio óptico (Zeiss), utilizando un hematocitómetro y se ajustaron en su propio medio a 1×10^6 /ml.

Eritrocitos humanos.

En los experimentos de adhesión y fagocitosis se utilizaron eritrocitos humanos frescos o fijados con glutaraldehído al 2.5% en solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.0 (PBS). La sangre se obtuvo por punción venosa con una jeringa estéril conteniendo 0.5 ml de solución Alsever

(Garvey y col., 1977). Los eritrocitos se lavaron tres veces con cinco volúmenes de PBS por centrifugación durante 10 min a 1000 X g, se ajustaron a 1×10^8 /ml en medio TYI-S-33 sin suero y se utilizaron frescos y refrigerados por no más de tres días. En algunos casos, después de lavar los eritrocitos con PBS, éstos se fijaron con glutaraldehído a temperatura ambiente durante 30 min y, posteriormente, se lavaron cinco veces con PBS. Finalmente, se ajustaron a 1×10^8 /ml en TYI-S-33 sin suero.

Cultivo de células epiteliales de la línea MDCK.

Las células epiteliales de la línea MDCK, (Madin Darby Cell Kidney, línea celular aislada de riñón de perro), se cultivaron en multicámaras de 24 pozos (Linbro, U.S.A.), en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Eagle, 1959), suplementado con suero de ternera al 10% (Gibco), 500 U/ml de penicilina y 0.69 µg/ml de estreptomina. Las células se incubaron a 37°C hasta que formaron monocapas confluentes y éstas se utilizaron vivas o fijadas con glutaraldehído al 2.5% en PBS. Las monocapas fijadas con glutaraldehído, se lavaron exhaustivamente con PBS, una vez con glicina 0.1 M y tres veces más con PBS.

Cultivo de bacterias.

Se utilizaron bacterias Escherichia coli de la cepa CR34 deficiente en la síntesis de timina (E. coli CR34 Tim⁻) para lo cual se mantuvieron en tubos de vidrio de 9 X 75 mm con

tapón de hule en 3 ml de medio de conservación que contenía 0.9% de caldo nutritivo (Difco), 0.5% de cloruro de sodio y 0.75% de bacto -agar (Difco) a temperatura ambiente. En algunos experimentos, se utilizó la cepa 055 de E. coli.

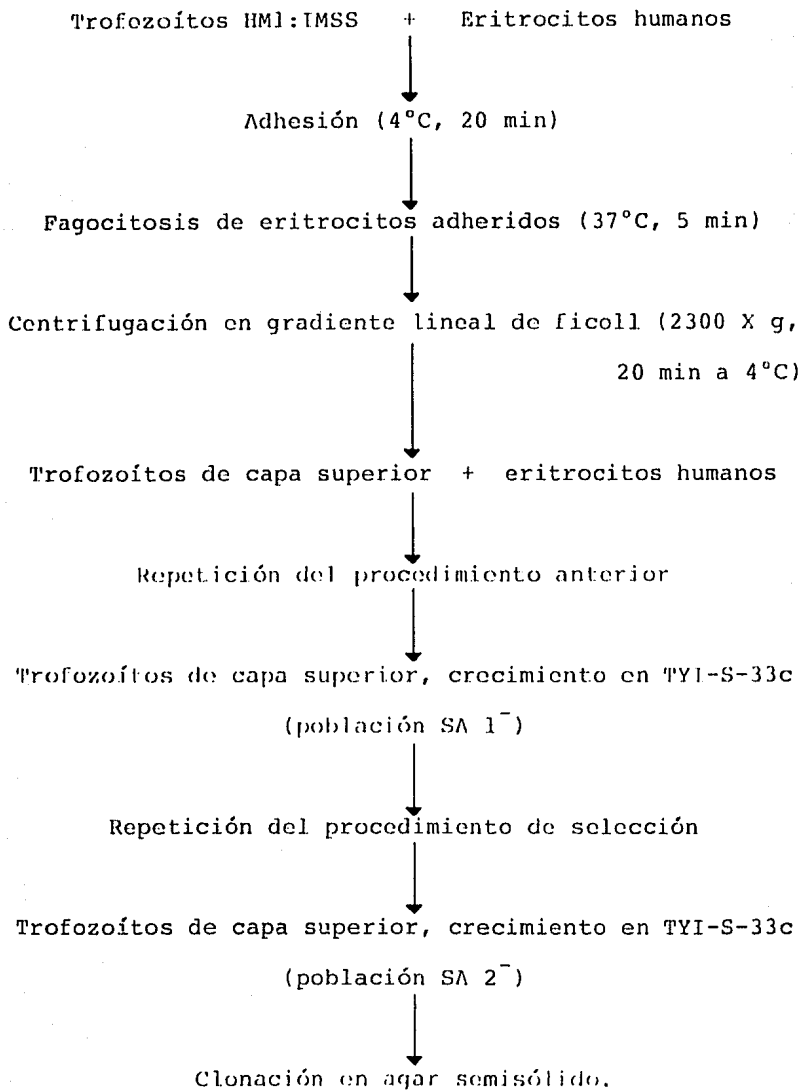
Previo a los experimentos de interacción con los trofozoítos, las bacterias se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación constante en medio líquido de Luria, el cual está compuesto de 1% de bacto triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio, pH 7.5. Posteriormente, se lavaron dos veces con solución salina por centrifugación a 9000 X g durante 10 min, para eliminar el medio de Luria y se ajustaron a 1×10^9 bacterias/ml en solución salina, utilizando un matraz nefelométrico y un fotocolorímetro (Klett Summerson) con filtro verde. La densidad de la población a 300 Unidades Klett, equivalió a una concentración de 1×10^9 bacterias/ml, de acuerdo a una curva patrón previamente realizada.

Selección de poblaciones amibianas deficientes en adhesión a eritrocitos.

Las poblaciones amibianas deficientes en adhesión a eritrocitos, se obtuvieron de acuerdo al esquema 2, que resume el procedimiento. 2.5 ml de suspensión de trofozoítos de la cepa HM1:IMSS (1×10^6 /ml), se mezclaron con 2.5 ml de eritrocitos humanos (1×10^8 /ml) frescos y lavados como se especificó anteriormente, la mezcla celular

ESQUEMA 2

Selección de poblaciones amibianas deficientes en
adhesión a eritrocitos.



se incubó durante 20 min a 0°C en un baño de agua-hielo para permitir la adhesión entre los trofozoítos y los eritrocitos. Posteriormente las células se incubaron a 37°C durante 5 min, para permitir que algunos eritrocitos fueran ingeridos y evitar así que se desprendieran durante el procesamiento. Inmediatamente, la suspensión celular se colocó en un tubo preparado previamente con un gradiente discontinuo de ficoll-paque, (Pharmacia Fine Chemicals) del 20 al 100%, preparado en agua bidestilada y se centrifugó durante 20 min a 2300 X g en una centrífuga Sorval RC-5B a 20°C, utilizando un rotor HB4. En la capa superior del gradiente, se localizaron las amibas que adhirieron pocos o ningún eritrocito, ésta se tomó cuidadosamente, se ajustó a 2.5 ml de TYI-S-33 y nuevamente se incubó con 2.5 ml de la suspensión de eritrocitos, para repetir el procedimiento de selección una vez más desde el principio. Las células de la capa superior de la segunda corrida del gradiente se tomaron y se sembraron en medio TYI-S-33c, a esta población se le llamó SA 1⁻. (1a. población de amibas deficientes en adhesión). Las amibas de la población SA 1⁻, se cultivaron hasta fase logarítmica y el procedimiento de selección se repitió para obtener la población SA 2⁻. (2a. población de amibas deficientes en adhesión).

Clonación en agar semisólido.

La eficiencia de clonación (EFC) de los trofozoítos, se determinó en agar semisólido, de acuerdo a la técnica de Gillin y Diamond (1978). Los trofozoítos se utilizaron en fase

logarítmica temprana de crecimiento, se despegaron de las paredes del tubo en un baño de agua-hielo, se centrifugaron por 7 min a 360 X g y se diluyeron con TYI-S-33 sin suero a una concentración de 1 amiba/ml. Por otra parte en botellas estériles de plástico de 40 ml (Falcon, U.S.A.) se colocaron 31 ml de medio TYI-S-33c y se incubaron en baño maría a 40°C por 30 min. Posteriormente, se agregaron 3.1 ml de agar (Difco) preparado al 5% (peso/peso) en medio TYI-S-33 y se agitaron vigorosamente para obtener una suspensión homogénea de agar con concentración final de 0.45%. Inmediatamente se agregaron 50, 100, y 200 µl de la suspensión de amibas, las botellas se agitaron suavemente una vez más, para dispersar las células homogéneamente en el agar y se colocaron en hielo durante 30 min para permitir la gelificación del agar. Posteriormente, las botellas falcon se incubaron a 37°C durante 5 a 7 días, las colonias se contaron para determinar la EFC y se aislaron varias colonias al azar. Para determinar la EFC, se utilizó como patrón de comparación la EFC de la cepa silvestre Hm1:IMSS, la de la clona L-6, la cual presenta deficiencia para crecer en agar semisólido y las de las subclonas H₁ y H₂, las cuales se obtuvieron al pasar la clona L-6 por hígado de hámsteres 1 y 2 veces respectivamente. La EFC se determinó mediante el número de placas visibles entre el número de trofozoítos inoculados multiplicado por 100, de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\text{EFC} = \frac{\text{No. de colonias obtenidas}}{\text{No. de trofozoítos inoculados}} \times 100$$

Adhesión de trofozoítos a eritrocitos.

Para los ensayos de adhesión entre trofozoítos y eritrocitos, se utilizó la técnica reportada por Orozco (1981). Los trofozoítos se incubaron con los eritrocitos frescos (1:100), a 0°C durante 5 y 10 min. La reacción se detuvo agregando 1 ml de glutaraldehído, e incubando las mezclas celulares durante 30 min a 37°C. Posteriormente las células se lavaron por tres veces con solución salina al 0.85%, se centrifugaron a 165 X g durante 3 min en una centrífuga clínica (SOL-BAT). Los eritrocitos se contrastaron con la tinción de Novikoff y col. (1972). Para tal efecto, se preparó una solución de diaminobencidina (Sigma), de 2 mg por cada mililitro de solución amortiguadora 2-amino, 2-metilpropanodiol (1,3) pH 9.7, a la cual se le agregó peróxido de hidrógeno al 0.02%. Las preparaciones se incubaron con 1 ml de esta solución durante 30 min a 37°C y se lavaron tres veces con solución salina. El número de eritrocitos adheridos por amiba se contó para cada tiempo y cepa en 100 amibas elegidas al azar, para lo cual se utilizó un microscopio óptico (Zeiss), a un aumento de 160 X.

Adhesión de trofozoítos a células epiteliales.

Para los ensayos de adhesión a células epiteliales, los trofozoítos se agregaron a monocapas celulares de la línea MDCK, previamente lavadas dos veces con solución salina en relación de 1:1. Las células con los trofozoítos se incubaron

a 37°C y a los 10 min se agregó 1 ml de glutaraldehído. Se obtuvieron los sobrenadantes y se contaron los trofozoítos no adheridos. La eficiencia de adhesión se obtuvo por diferencia entre los trofozoítos agregados y los no adheridos, dividida entre el número de trofozoítos agregados y multiplicando por 100, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Efic. de adhesión} = \frac{\text{t. totales} - \text{t. no adheridos}}{\text{trofozoítos no adheridos}} \times 100$$

Efecto citopático sobre células epiteliales.

Para los experimentos de destrucción de las monocapas celulares se utilizó la técnica previamente descrita por Orozco y col., (1978) que consistió en agregar los trofozoítos en relación de 1:1 a las monocapas celulares de la línea MDCK cultivadas en multicámaras Linbro (U.S.A.). Las células epiteliales con los trofozoítos se incubaron primero a 37°C durante 1 h para llevar a cabo la interacción. Después de este tiempo, las monocapas se incubaron a 0°C durante 15 min para desprender los trofozoítos no adheridos a la monocapa. Posteriormente, las monocapas se lavaron tres veces con solución salina, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS a temperatura ambiente por 15 min y se lavaron con solución salina tres veces. Las monocapas se tiñeron con 1 ml de azul de metileno al 1% en solución amortiguadora de boratos 0.1 M, pH 8.7, durante 10 min, posteriormente, las monocapas celulares se lavaron tres veces con solución

amortiguadora de boratos 0.01 M, pH 8.7 para quitar el exceso de colorante. El colorante adherido a las monocapas o a los restos de ella se extrajo agregando a cada pozo 1 ml de ácido clorhídrico (HCL) 0.1 N e incubando a 37°C por 30 min. El sobrenadante con el colorante extraído se diluyó 1:10 con HCL 0.1 N y se leyó la densidad óptica a 660 nm en un espectrofotómetro (Zeiss). Como controles se utilizaron monocapas celulares que no estuvieron en contacto con los trofozoítos.

Fagocitosis de eritrocitos.

Para estos experimentos se utilizó la técnica descrita previamente por Trissl y col., (1978). Los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento se ajustaron a 1×10^6 /ml de medio TYI-S-33 sin suero, 0.4 ml de esta suspensión se incubaron con 0.4 ml de eritrocitos frescos diluidos en medio TYI-S-33 sin suero a 1×10^8 /ml, lo que corresponde a una relación de 1 trofozoíto por cada 100 eritrocitos. La incubación se realizó durante 5 y 10 min en un baño maría a 37°C, la reacción se detuvo a los tiempos preestablecidos, agregando agua bidestilada e incubando las preparaciones para romper los eritrocitos no ingeridos. Posteriormente, se centrifugó a 165 X g por 3 min, las amibas con los eritrocitos ingeridos se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS a 37°C durante 30 min, se lavaron por tres veces con solución salina y los eritrocitos ingeridos se contrastaron con la tinción de Novikoff (Novikoff y col., 1972). Al

término de este tiempo, las preparaciones se lavaron tres veces con solución salina. Posteriormente, los eritrocitos ingeridos por amiba se contaron en 100 amibas elegidas al azar y se obtuvieron los promedios para cada tiempo y clona. La cuenta se realizó en un microscopio óptico, como ya se indicó.

Fagocitosis de esferas de látex.

Para estos ensayos se utilizaron las esferas de látex coloreadas de azul, de 7.5 μm de diámetro (Sigma). Las esferas se lavaron cinco veces con PBS, se agitaron en un agitador Vortex, para obtener una suspensión monodispersa y se ajustaron a 1×10^8 /ml de medio TYI-S-33 sin suero. Los trofozoítos se incubaron con las esferas de látex en una relación de 1:100 a 37°C durante 30 y 60 min. La reacción de fagocitosis se detuvo agregando 1 ml de glutaraldehído al 2.5% en PBS durante 30 min a 37°C. Posteriormente, los trofozoítos con las esferas de látex se lavaron con solución salina por cinco veces. El número de esferas ingeridas por trofozoíto, se contó en el microscopio óptico en 100 trofozoítos elegidos al azar en forma semejante como se describió para los ensayos de fagocitosis de eritrocitos y se obtuvo el promedio de esferas fagocitadas por trofozoíto para cada tiempo y clona.

Ensayo de hemaglutinación.

Para determinar la actividad de lectina en los extractos de trofozoítos amibianos, se realizaron experimentos de

hemaglutinación de acuerdo a la metodología descrita por Kobiler y Mirelman (1980). Los extractos crudos amibianos, se prepararon con células en fase de crecimiento logarítmico, para lo cual los trofozoítos se lavaron una vez con PBS, pH7, a 4°C y una vez con solución salina a 4°C. Los trofozoítos se ajustaron a 1×10^6 /ml en solución amortiguadora de hemaglutinación (PBS 0.02 M pH 5.7, fluoruro de fenil metil sulfonil 5 μ M (Sigma) y beta-mercaptoetanol 1 mM (Merck). Los extractos se prepararon rompiendo los trofozoítos por congelación en acetona-hielo seco y descongelación inmediata a 37°C por tres veces. Posteriormente, la suspensión de trofozoítos rotos se centrifugó a 4°C en una centrífuga Eppendorf durante 5 min. Las pastillas se resuspendieron en 1 ml de solución amortiguadora de hemaglutinación y se homogeneizaron en un homogenizador (Curtin) con émbolo de teflón durante 1 min. Con esta mezcla, correspondiente a 1×10^6 amibas/ml, se hicieron diluciones binarias con solución amortiguadora de hemaglutinación desde 1:2 hasta 1:512. La hemaglutinación se realizó en placas con pozos en forma de U (Linbro). En cada pozo se agregaron 25 μ l de albúmina sérica bovina al 1%, 25 μ l de PBS pH 5.7 y 25 μ l de eritrocitos humanos fijados con glutaraldehído al 2.5% en PBS. Las placas se agitaron cuidadosamente y se incubaron 1 h a temperatura ambiente. El título de aglutinación se midió como la inversa de la dilución más alta de los extractos amibianos que produjo hemaglutinación.

Ensayo de virulencia "in vivo".

La virulencia de las clonas obtenidas en este trabajo, se midió "in vivo" mediante la inoculación intraportal de los trofozoítos amibianos en hámsteres dorados (Mesocricetus auratus), machos de aproximadamente 100 g de peso. Los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento, se despegaron de las paredes del tubo por enfriamiento a 0°C, se centrifugaron y se ajustaron a una concentración de 2.5×10^5 amibas/ml de medio TYI-S-33 sin suero. Los hámsteres fueron anestesiados con anestosal (Norden, Méx.), diluido 1:10 en agua bidestilada estéril, de esta solución, se inyectó intraperitonealmente 1 ml por cada 100 g de peso del animal. Posteriormente, se practicó laparatomía amplia y se localizó la vena porta, en la cual se inocularon 0.5 ml de la suspensión de trofozoítos, utilizando jeringas de 1 ml con agujas del número 27. Al terminar la inoculación, se selló el orificio de la vena con anticoagulante (Gelfoam, Upjohn), los hámsteres se cosieron en dos planos, el muscular y el de la piel y se dejaron recuperar de la anestesia.

Los hámsteres se sacrificaron 8 días después de la inoculación anestesiándolos previamente con cloroformo, el hígado se extrajo y se valoraron los abscesos de acuerdo a su número y tamaño. Para localizar la presencia de abscesos, el hígado se examinó cuidadosamente con lente de aumento. La presencia de trofozoítos en los abscesos, se comprobó

haciendo preparaciones de las lesiones para observarlas en el microscopio y sembrando los abscesos previamente disgregados en medio TYI-S-33c e incubando a 37°C por varios días para comprobar la presencia de trofozoítos.

Dosis media de virulencia.

Para obtener la dosis media de virulencia de los trofozoítos de E. histolytica de las cepas HM1:IMSS virulenta, HK9:NIH de virulencia atenuada y de clona I-6 no virulenta (la cual fue aislada a partir de la cepa HM1:IMSS por Orozco, 1981). Se inocularon camadas de cuando menos 8 hámsteres, como ya se describió anteriormente con diferente número de trofozoítos; 0.05, 0.15, 0.3, 0.75, 1.5, 3.0, 6.5, 12.5 y 25 $\times 10^4$ células de la cepa HM1:IMSS; 5, 10, 25, 30, 50, 60, 75 y 85 $\times 10^4$ células de la cepa HK9; y 10, 20, 40, 60 y 75 $\times 10^4$ células de la clona I-6.

Los diferentes inóculos de amibas, se inocularon en 0.5 ml de medio TYI-S-33 sin suero, utilizando para cada dosis 8 hámsteres.

Virulencia de los trofozoítos en interacción con bacterias.

Para los ensayos de virulencia de los trofozoítos en interacción con bacterias, se utilizaron bacterias Escherichia coli de la cepa 055, irradiadas hasta completa inactivación con luz ultravioleta, aproximadamente durante

4 h y trofozoítos de la cepa HMI:IMSS, HK9 y la clona L-6. La interacción de los trofozoítos con las bacterias, se llevó a cabo en una relación de 1:1000 a 37°C durante 30 min, después de la interacción, los trofozoítos se inocularon en los hámsteres, como ya se indicó anteriormente y, a los 8 días postinoculación, se sacrificaron para evaluar la formación de abscesos. Como control se inocularon hámsteres con bacterias.

Adhesión de trofozoítos en interacción con bacterias.

Con el objeto de definir si las bacterias aumentaban la eficiencia de adhesión se midió la adhesión de los trofozoítos a eritrocitos humanos, previa interacción con bacterias. Los trofozoítos de dos cepas de E. histolytica con diferente virulencia, la cepa HMI:IMSS virulenta y la cepa HK9 de virulencia atenuada se preincubaron con bacterias E. coli de la cepa 055 durante 30 min a 37°C y en relación de 1:1000. Posteriormente, se adicionaron eritrocitos humanos frescos en relación de 1:100 y se determinó la adhesión durante 5 min a 0°C, como se indicó anteriormente.

Eritrofagocitosis de trofozoítos en interacción con bacterias.

Se ha encontrado que las bacterias tienen un efecto activador sobre la virulencia de los trofozoítos de E. histolytica (Bos y Hage 1975; Wittner y Rosebaum 1970). Por tanto, se realizaron experimentos con varias cepas y clones en interacción con bacterias. Para los ensayos de

fagocitosis se utilizaron las bacterias de la cepa E. coli CR34 Tim⁻, las cuales se cultivaron durante toda la noche en medio de Luria, después se lavaron dos veces con solución salina a 9000 X g durante 10 min y se ajustaron a 1×10^9 /ml de solución salina, como ya se indicó anteriormente. Los trofozoítos se utilizaron en fase de crecimiento logarítmico y se ajustaron en su propio medio sin suero a 1×10^6 células/ml.

La interacción de los trofozoítos con las bacterias se llevó a cabo en una relación de 1:1000 a 37°C durante 30 min en agitación. Inmediatamente después de la interacción se adicionaron eritrocitos humanos frescos ajustados a 1×10^8 /ml de TYI-S-33 sin suero en una relación de 100 eritrocitos por cada trofozoíto y se incubaron a 37°C por 5 min, la reacción se detuvo agregando agua bidestilada durante 10 min para romper los eritrocitos no ingeridos y los trofozoítos se recuperaron centrifugando a 360 X g durante 5 min, la pastilla se fijó con 0.5 ml de glutaraldehído a 37°C durante 30 min y se lavó tres veces con solución salina. Los eritrocitos se contrastaron con 0.5 ml de solución de diaminobencidina a 37°C durante 30 min (Novikoff y col., (1972)). Posteriormente la suspensión celular se lavó tres veces con solución salina a 360 X g durante 5 min para eliminar los eritrocitos no fagocitados y finalmente se contaron en un microscopio óptico los eritrocitos ingeridos por amiba en 50 trofozoítos elegidos al azar. El

esquema 3 resume el método utilizado.

Efecto citopático de los trofozoítos en interacción con bacterias.

El efecto citopático de los trofozoítos de diferentes cepas y clonas de E. histolytica sobre células en cultivo (previa interacción con bacterias), fue medido en función de la velocidad de destrucción de monocapas confluentes de células de la línea MDCK, de acuerdo a la técnica de Orozco y col., (1978). En el esquema 4 se sintetiza el procedimiento empleado.

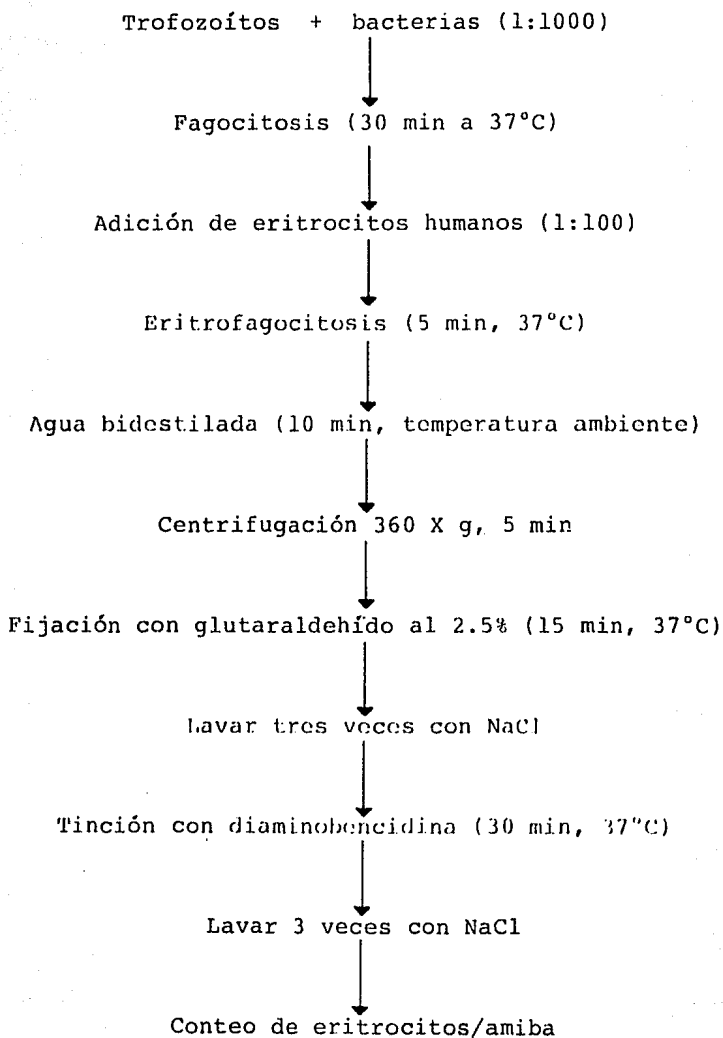
La interacción de las amibas con las monocapas celulares se llevó a cabo a 37°C durante 3 h aproximadamente hasta que una de las monocapas fue destruida por los trofozoítos. Al término de este tiempo se retiraron los sobrenadantes y se procedió a evaluar el grado de destrucción de la monocapa en forma cuantitativa como ya se describió anteriormente. Como controles positivos, se utilizaron monocapas celulares con trofozoítos sin haber estado en contacto con bacterias y como controles negativos, se utilizaron monocapas celulares que no estuvieron en contacto con los trofozoítos.

Actividad tóxica de los trofozoítos en interacción con bacterias.

La "actividad de toxina" de los extractos de los trofozoítos de la cepa HK9 y de las clonas A, 1-6 y 23

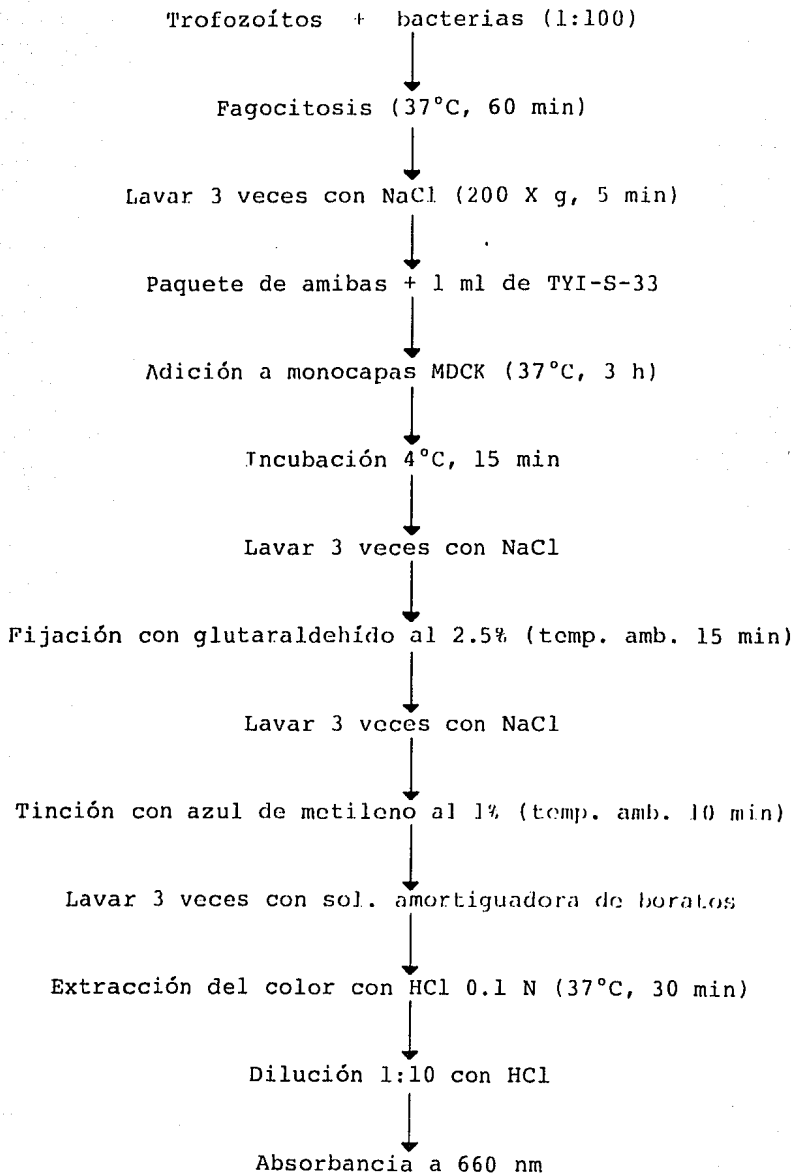
ESQUEMA 3

Eritrofagocitosis de trofozoítos en interacción
con bacterias.



ESQUEMA 4

Efecto citopático de los trofozoítos en interacción
con bacterias.



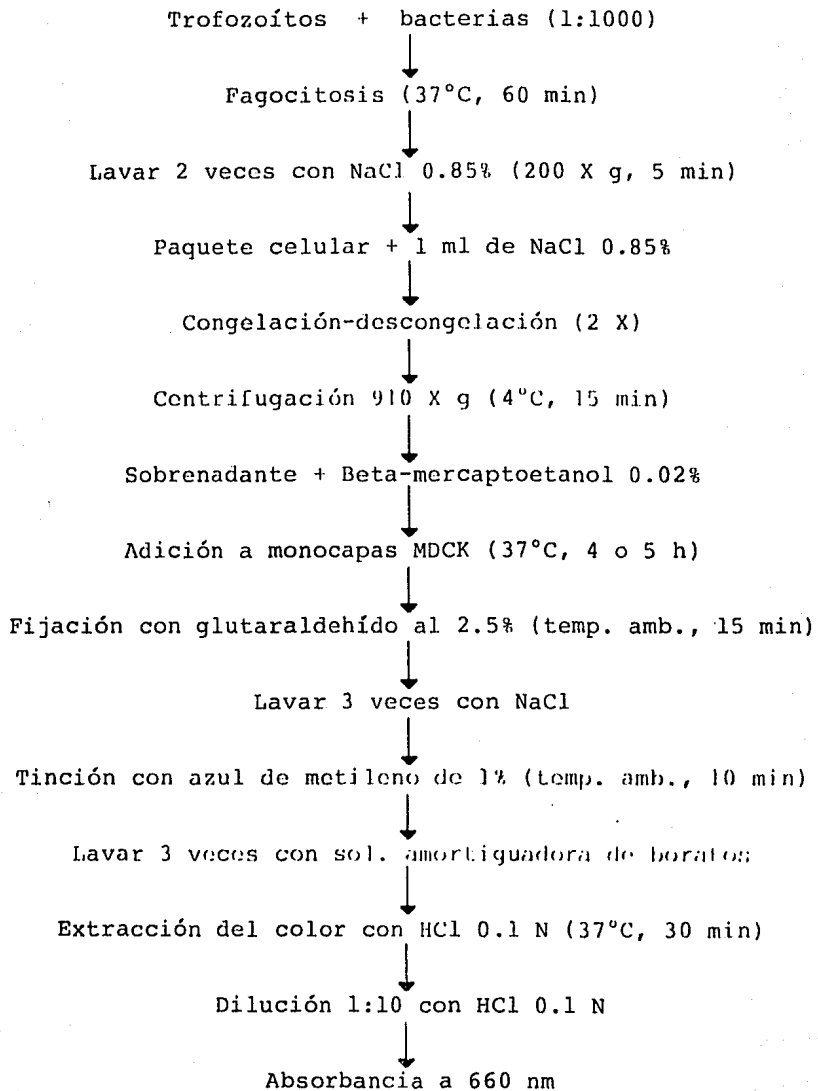
previamente en interacción con bacterias, se determinó mediante la técnica descrita para la preparación de los extractos amibianos por Bos (1979); Lushbaugh y col., (1979); Mattern y col., (1980). La metodología empleada se resume en el esquema 5. Bacterias de la cepa CR34 "im" se prepararon como ya se describió.

La interacción de las amibas con las bacterias, se llevó a cabo en una relación de 1:1000 a 37°C por 60 min, al término de este tiempo, la mezcla celular se lavó dos veces con solución salina a 200 X g durante 5 min para eliminar las bacterias no fagocitadas. Los sobrenadantes se descartaron, se adicionó 1 ml de solución salina a la pastilla que inmediatamente se congeló en acetona-hielo seco y se descongeló a 37°C dos veces para romper los trofozoítos; posteriormente, se centrifugó a 910 X g durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se separaron de las pastillas, se les agregó beta-mercaptoetanol 0.02 % y se agregaron a las monocapas confluentes de células epiteliales de la línea MDCK, cultivadas en multicámara, previamente lavadas una vez con solución salina.

Las monocapas con los extractos amibianos, se incubaron a 37°C durante 3 a 5 h, al término de este tiempo se retiraron los sobrenadantes y las monocapas se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS por 15 min a temperatura ambiente. Las multicámaras se lavaron tres veces con solución salina, se tificaron con azul de metileno al 1 %, se

ESQUEMA 5

Actividad de toxina de los trofozoítos en interacción
con bacterias.



volvieron a lavar por tres veces con solución amortiguadora de boratos y se extrajo el color con HCl, como ya se indicó anteriormente. Finalmente, se determinó la absorbancia a 660 nm en el espectrofotómetro, para obtener el valor cuantitativo del grado de destrucción de la monocapa producido por los extractos amibianos.

Efecto citopático de los trofozoítos en interacción con eritrocitos humanos.

El efecto citopático de los trofozoítos de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23 sobre células en cultivo de la línea MDCK, previa interacción con eritrocitos humanos en relación de 1:100 durante 30 min a 37°C, se determinó como se mencionó anteriormente. Los eritrocitos se eliminaron por lavado previo a medir la citopatogenicidad.

Actividad de toxina de los trofozoítos en interacción con eritrocitos humanos.

La "actividad de toxina" de los extractos de los trofozoítos de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23 previa interacción con eritrocitos humanos en relación de 1:100 durante 60 min a 37°C se realizó como se indicó anteriormente. Los eritrocitos también se eliminaron previamente en estos experimentos.

RESULTADOS.

Selección de poblaciones amibianas deficientes en adhesión a eritrocitos.

Es generalmente aceptado que la adhesión de los microorganismos a las células epiteliales, es un evento importante para la colonización e invasión de los tejidos, (Smith y col., 1979). En *E. histolytica*, Ravdin y col., (1980) y Orozco, (1981), han descrito que para que los trofozoítos produzcan daño, es necesario que se adhieran a la célula blanco. Dado que uno de los objetivos de la presente tesis fue aportar mayores evidencias para definir si la adhesión es necesaria en la fagocitosis y en la citopatogenicidad amibiana, se realizaron estudios en los que se seleccionaron como células blanco de la amiba a los eritrocitos humanos de diferentes grupos sanguíneos y a células epiteliales de la línea MDCK. Una de las estrategias utilizadas para este estudio, fue la obtención de clonas amibianas deficientes en adhesión a eritrocitos humanos, para posteriormente caracterizarlas en sus propiedades de virulencia.

El procedimiento diseñado para aislar trofozoítos deficientes en adhesión a eritrocitos humanos, comprendió el uso de la cepa HMI:IMSS, la cual es altamente heterogénea en cuanto a que los trofozoítos que la componen, presentan diferentes propiedades de virulencia (Orozco y col., 1985).

Los trofozoítos de esta cepa se sometieron por dos veces consecutivas a los ensayos de enriquecimiento de la población celular en trofozoítos no adhesivos, de acuerdo a la metodología descrita en la sección de Materiales y Métodos. Este procedimiento se basó en la separación de los trofozoítos en un gradiente de ficoll, de acuerdo a su densidad. La densidad de los trofozoítos, dependió del número de eritrocitos adheridos. En la figura 1, se muestra que en estos experimentos se obtuvieron 3 capas en el gradiente:

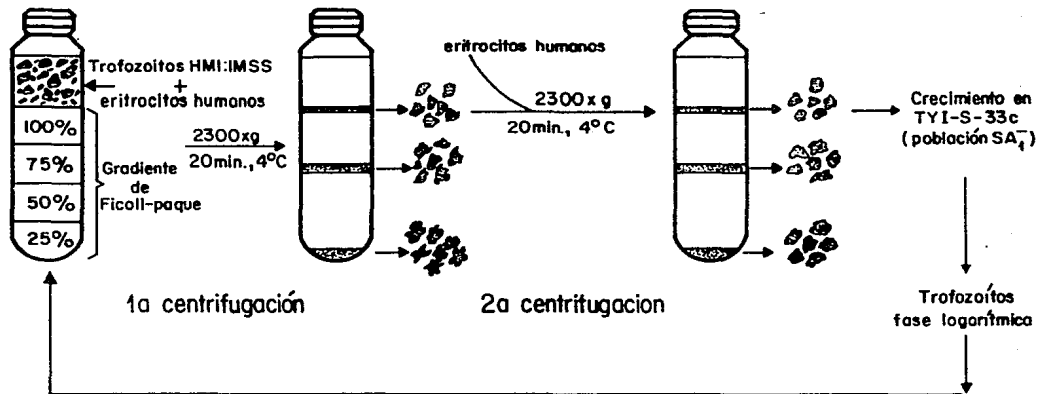
- a) La capa superior de color claro con trofozoítos que adhirieron pocos o ningún eritrocito,
- b) La capa intermedia de color rojizo con trofozoítos que adhirieron un número intermedio de eritrocitos, y
- c) La pastilla de color rojo con los trofozoítos que adhirieron la mayor cantidad de eritrocitos.

La capa superior del gradiente con trofozoítos sin, o con muy pocos eritrocitos, se aisló cuidadosamente con una pipeta Pasteur estéril, se transfirió a medio TYI-S-33c y se incubó a 37°C. A los trofozoítos obtenidos en esta primera selección, se les denominó población SA 1⁻. Cuando alcanzó la fase logarítmica de crecimiento, el procedimiento de selección se repitió y se obtuvo la población denominada SA 2⁻ (segunda población de trofozoítos deficientes en adhesión a eritrocitos).

FIGURA 1.

Selección de trofozoítos deficientes en adhesión a eritrocitos humanos. Los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS se seleccionaron por su deficiencia para adherir eritrocitos humanos centrifugando a través de un gradiente discontinuo de ficoll por dos veces consecutivas a 2300 X g durante 20 min a 4°C, la población obtenida (SA 1⁻) se separó y se creció en medio TYI-S-33c, cuando alcanzó la fase logarítmica, se repitió el procedimiento de igual manera y se obtuvo la población SA 2⁻.

Selección de trofozoítos deficientes en adhesión a eritrocitos humanos



Adhesión a eritrocitos.

Para comprobar si la población SA 2⁻ era deficiente en adhesión, los trofozoítos de ésta, se incubaron a 4°C por 5 y 10 min con eritrocitos humanos; posteriormente se contaron los eritrocitos adheridos en 100 trofozoítos elegidos al azar y se obtuvieron los promedios de eritrocitos por trofozoíto. En la figura 2, se muestra que los trofozoítos de la población SA 2⁻ a los 5 min de interacción, adhirieron el 50% de los eritrocitos que adhirió la cepa silvestre. Sin embargo, a los 10 min, los trofozoítos de la población SA 2⁻ adhirieron el 73% de los eritrocitos que adhirió la cepa silvestre, resultando una deficiencia de sólo el 27%. Estos resultados sugirieron que la población SA 2⁻ estaba enriquecida en trofozoítos deficientes en adhesión a eritrocitos.

Formación de colonias en agar semisólido.

Con el objeto de obtener poblaciones homogéneas de las subpoblaciones SA 1⁻ y SA 2⁻, los trofozoítos de éstas, se inocularon en agar semisólido, de acuerdo a la técnica de Gillin y Diamond, (1978), para aislar posteriormente varias clonas y caracterizarlas. Como controles, se utilizaron los ya mencionados en la sección de Materiales y Métodos.

En la figura 3, se observa que la población SA 2⁻ y la cepa silvestre HMI:IMSS, presentaron una EFC del 90 y 70% respectivamente. La EFC fue mucho mayor que la de la clona

FIGURA 2.

Adhesión de trofozoítos de la población SA 2⁻ a eritrocitos humanos. Los trofozoítos de la cepa Hm1:IMSS y de la población SA 2⁻ se incubaron con eritrocitos humanos a 4°C durante 5 y 10 min en una relación de 1:100. Las mezclas celulares se fijaron con glutaraldehído, se lavaron con PBS y se contrastaron con diaminobencidina. Los trofozoítos adheridos en 100 trofozoítos elegidos al azar se contaron en el microscopio óptico y se obtuvieron promedios de eritrocitos por amiba para cada tiempo.

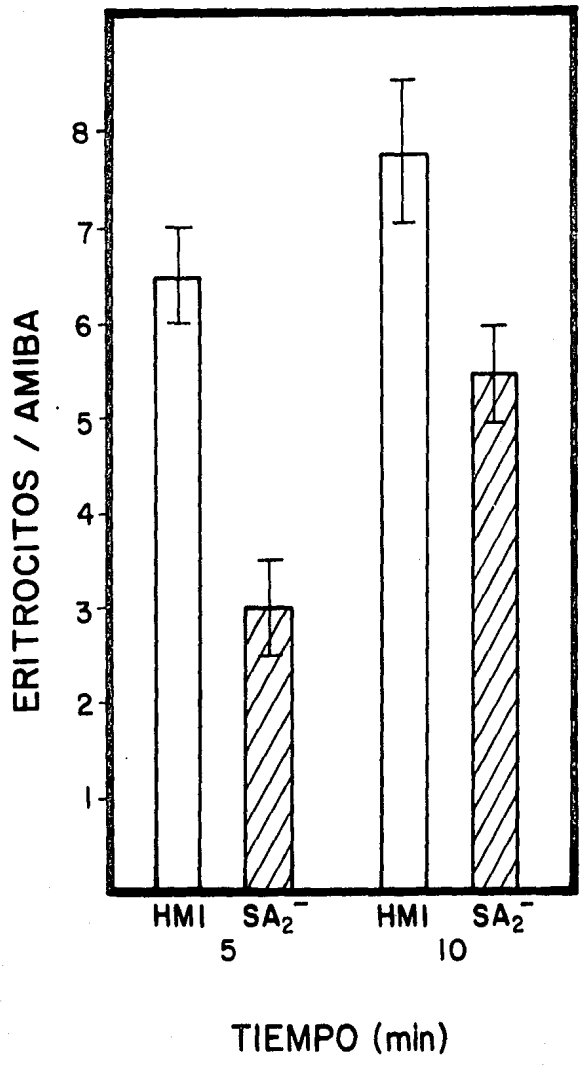
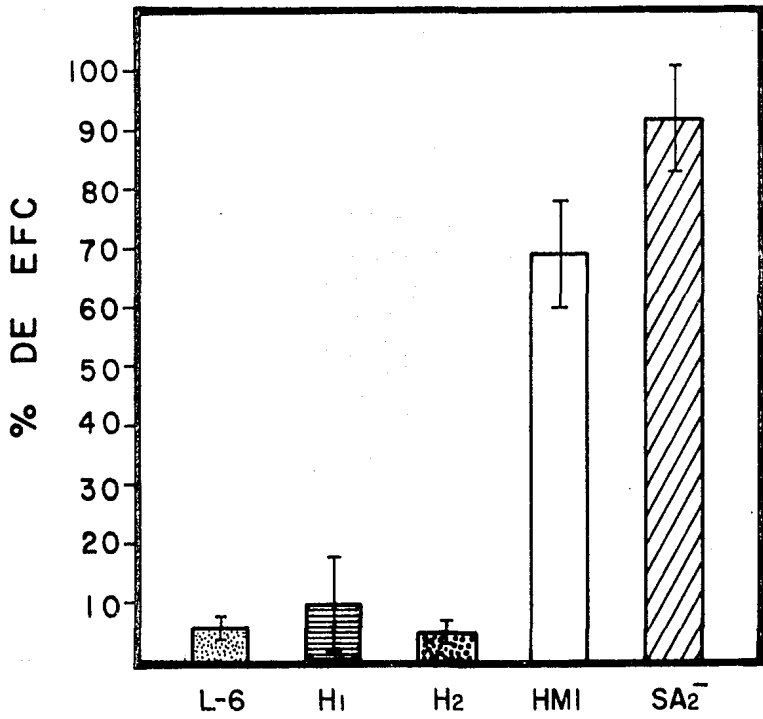


FIGURA 3.

Eficiencia de formación de colonias en agar semisólido.

Los trofozoítos de la población SA 2⁻, de la cepa HM1:IMSS, la clona L-6 y las subclonas H₁ y H₂ se inocularon en agar semisólido al 0.45 % en TYI-S-33. Se incubaron a 37°C y después de 5 a 7 días, se contó el número de colonias. La eficiencia relativa de formación de colonias, se obtuvo dividiendo el número de colonias obtenido entre el número de trofozoítos inoculados y multiplicando por 100.



C E P A

L-6 y la de las subclonas H₁ y H₂, ya que éstas presentaron una EFC menor del 10%. Por tanto, el método de obtención de clonas por inoculación en agar semisólido, resultó adecuado para el aislamiento de clonas deficientes en adhesión a eritrocitos. Por medio de esta metodología se seleccionaron clonas al azar y se cultivaron en medio TYI-S-33c para caracterizarlas.

Eficiencia de adhesión a eritrocitos humanos de las clonas SA 2⁻.

Las clonas seleccionadas, se cultivaron en medio líquido hasta fase logarítmica y se analizaron para determinar si existían diferencias en la adhesión a eritrocitos humanos a los 5 y 10 min, con respecto a la cepa silvestre. Los resultados obtenidos, mostraron que el 20% de las clonas aisladas a partir de la población SA 2⁻, presentaron deficiencia para adherir eritrocitos humanos. En la figura 4, se muestra la eficiencia de adhesión de la cepa Hm1:IMSS y de las clonas 4, 5, 6, 8 y 10, aisladas del agar semisólido a partir de la subpoblación SA 2⁻. En general, las clonas presentaron deficiencia para adherir eritrocitos desde los 5 min de interacción; esta deficiencia, fue más evidente a los 10 min. Al final del tiempo de interacción, la deficiencia en adhesión de las clonas 4, 5, 8 y 10, fue mayor del 50%, en comparación con la cepa silvestre Hm1:IMSS. La clona 6, presentó mayor capacidad para adherir eritrocitos que el resto de las clonas; sin embargo, los trofozoítos de ésta

también se consideraron deficientes en adhesión, pues sólo adhirieron el 70% de los que adhirió la cepa silvestre. Estos resultados confirmaron que las clonas obtenidas fueron deficientes en su capacidad para adherir eritrocitos humanos.

Fagocitosis de eritrocitos de las clonas SA 2⁻.

Se ha reportado que la adhesión de los trofozoítos a los eritrocitos es un evento importante para que la eritrofagocitosis se realice con eficiencia máxima (Orozco y col., 1982b), por lo que era lógico suponer que las clonas deficientes en adhesión pudieran presentar deficiencia en fagocitosis, como resultado de su incapacidad para adherir eritrocitos. Se midió el grado de eritrofagocitosis de las clonas deficientes en adhesión a los 5 y 10 min de interacción con eritrocitos humanos. Dado que la eritrofagocitosis es dependiente de temperatura, los experimentos de incubación para los ensayos se realizaron a 37°C. En la figura 5, se muestra que todas las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos humanos, presentaron deficiencia en eritrofagocitosis desde los 5 min de interacción, en comparación con la cepa silvestre HMI:IMSS. Esta diferencia se hizo más marcada a los 10 min, ya que se observa que a este tiempo las clonas deficientes en adhesión fagocitaron aproximadamente el 50% de los eritrocitos que fagocitó la cepa silvestre. Mientras la cepa HMI:IMSS fagocitó un promedio de 12 eritrocitos/amiba, la clona 5 fagocitó en promedio 7 eritrocitos/amiba, la clona 6 fagocitó

FIGURA 4.

Adhesión de trofozoítos de las clonas SA 2⁻ a eritrocitos humanos. Los trofozoítos de la cepa Hm1:IMSS (O - O), de las clonas 4 (X - X), 5 (O - O), 6 (□ - □), 8 (▲ - ▲) y 10 (△ - △) se incubaron con eritrocitos humanos a 4°C durante 5 y 10 min. La reacción se detuvo añadiendo a cada preparación 1 ml de glutaraldehído, las preparaciones se contrastaron con diaminobencidina y se contaron los eritrocitos adheridos en 100 amibas. Se obtuvieron promedios de eritrocitos por amiba.

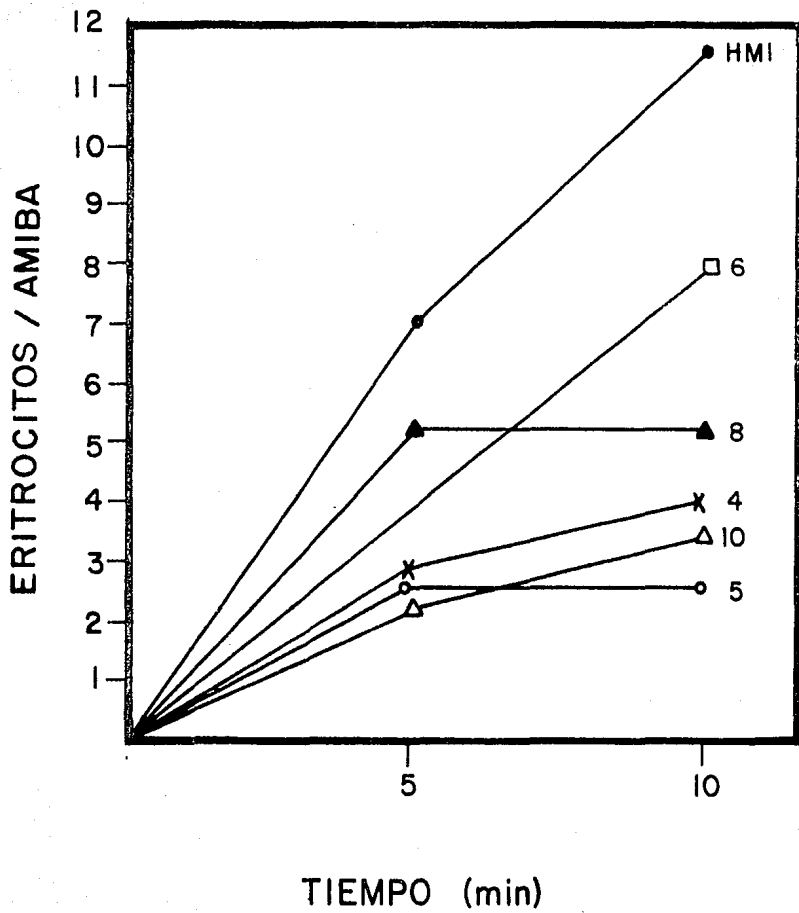
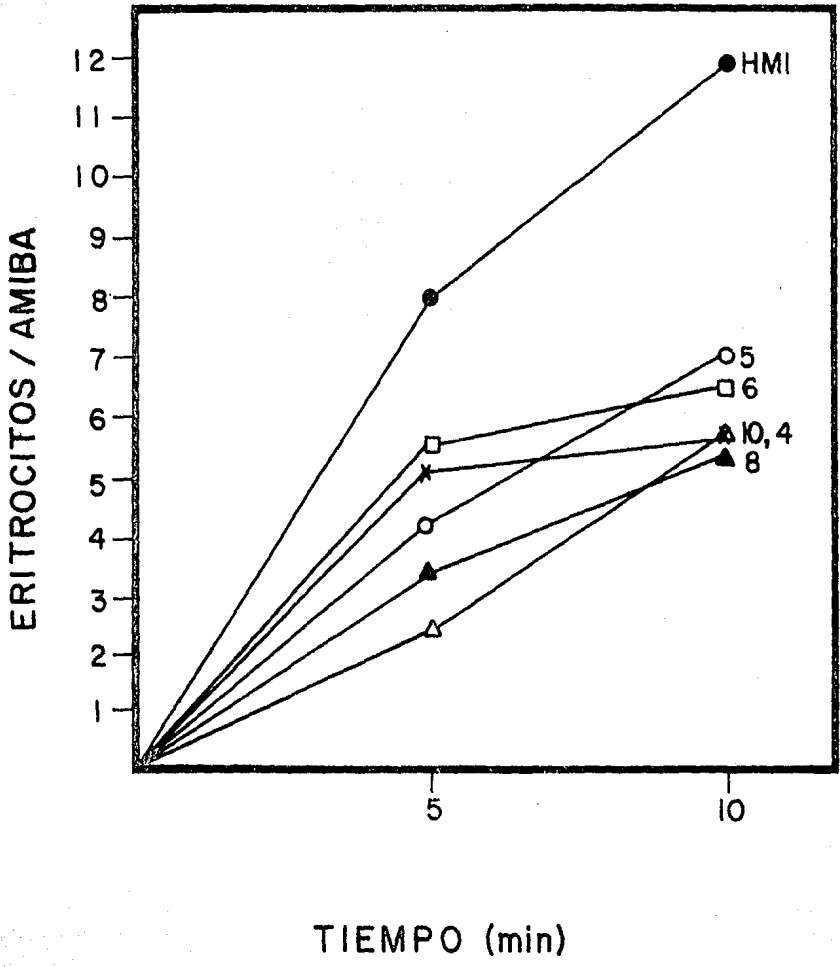


FIGURA 5.

Eritrofagocitosis de las clonas SA 2⁻. Trofozoítos de las clonas 4 (X - X), 5 (O - O), 6 (□ - □), 8 (▲ - ▲) y 10 (△ - △) y de la cepa HMI:IMSS (O - O), se incubaron con eritrocitos humanos a 37°C. A los 5 y 10 min, la reacción se detuvo agregando agua bidestilada para lisar los eritrocitos no ingeridos. Las preparaciones se fijaron con glutaraldehído y se contrastaron con diaminobencidina. Los eritrocitos ingeridos se contaron en 100 amibas al azar y se obtuvieron promedios de eritrocitos por amiba.



6.5, las clonas 4 y 10 fagocitaron 5.5 y la clona 8 sólo fagocitó un promedio de 5 eritrocitos/amiba.

Con el objeto de corroborar que la deficiencia en eritrofagocitosis presentada por las clonas aisladas en este trabajo se debía a que los eritrocitos no se adherían eficientemente a la superficie de la amiba, más que a una deficiencia en la introducción de partículas al citoplasma, se obtuvieron las relaciones entre el número de eritrocitos adheridos y el número de eritrocitos fagocitados (Adhesión/ Eritrofagocitosis A/E) de cada una de las clonas para compararlas con la de la cepa HMI:IMSS. En la tabla I, se muestra que las clonas 4, 5, 8 y 10 deficientes en adhesión tienen una relación A/E menor que la de la cepa silvestre. La clona 4 presentó una relación de 0.72, ya que adhirió 4 eritrocitos y fagocitó 5.5, la clona 5 tuvo una relación de 0.28, pues adhirió 2.7 eritrocitos y fagocitó 7, la clona 8, 0.96, ya que adhirió 5.2 eritrocitos y fagocitó 5.4 y la clona 10 presentó 0.63, puesto que adhirió 3.5 y eritrofagocitó 5.5. La clona 6 cuya deficiencia en adhesión es menor que la del resto de las clonas, presentó una relación mayor de 1, lo cual sugiere que su deficiencia en fagocitosis se podría deber a que el proceso de ingestión está alterado.

Fagocitosis de esferas de látex.

La hipótesis que se estableció para explicar los resultados anteriores, se basó fundamentalmente en que la

TABLA I.

RELACION DE ADHESION Y FAGOCITOSIS DE LAS CLONAS SA 2⁻.

CLONA	ADHESION	ERITROFAGOCITOSIS	A/E
HM1:IMSS	12.0	12.0	1.0
4	4.0	5.5	0.72
5	2.7	7.0	0.28
6	8.2	6.2	1.3
8	5.2	5.4	0.96
10	3.5	5.5	0.63

Adhesión = 4°C.

Eritrofagocitosis = 37°C.

Se midió la adhesión y la eritrofagocitosis de trofozoítos de las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos y de la cepa silvestre HM1:IMSS, de acuerdo a las técnicas utilizadas, para obtener la relación de la adhesión y la eritrofagocitosis. Los datos de la columna de adhesión y eritrofagocitosis, son promedios de eritrocitos por amiba.

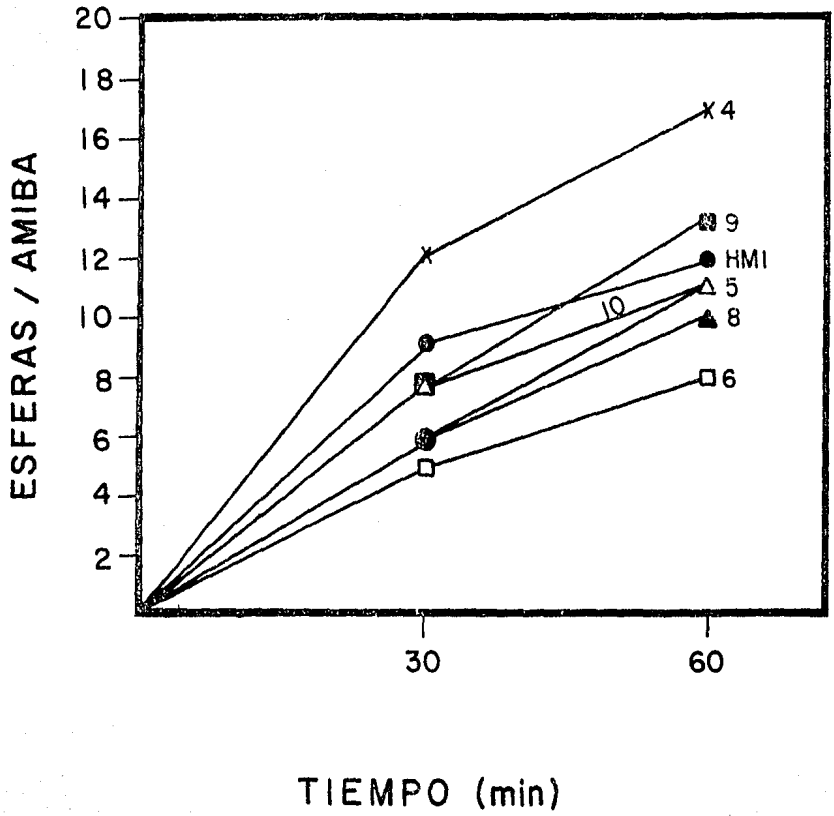
deficiencia en la adhesión específica de eritrocitos humanos a la superficie amibiana era el factor responsable de la deficiencia en eritrofagocitosis, asumiendo que las clonas deficientes en adhesión pudieran tener alteraciones en su superficie, las cuales estuvieran relacionadas con las moléculas amibianas que hacen contacto con la superficie de los eritrocitos. Esto tendría como consecuencia una disminución en la fagocitosis específica, pero no alteraría la fagocitosis inespecífica, la cual no está mediada por receptores (Orozco y col., en prensa).

Para definir esto, se realizaron experimentos de fagocitosis de esferas de látex, tanto de las clonas deficientes en adhesión como de la cepa silvestre. El racional de este experimento se fundamentó en el hecho de que la fagocitosis de esferas de látex debe ser inespecífica y probablemente mediada por fuerzas electrostáticas y no por receptores específicos. La figura 6 demuestra que la fagocitosis de esferas de látex de las clonas deficientes en adhesión, es semejante a la de la cepa silvestre HMI:IMSS a los dos tiempos medidos de 30 y 60 min. Estos resultados apoyan la sugerencia de que la deficiencia en eritrofagocitosis mostrada por las clonas 4, 5, 6, 8 y 10, se debió a una deficiencia en la capacidad de los trofozoítos para adherir específicamente eritrocitos humanos.

FIGURA 6.

Fagocitosis de esferas de látex por las clonas SA 2⁻.

Trofozoítos de las cepas HM1:IMSS (O - O) y de las clonas 4 (X - X), 5 (O - O), 6 (□ - □), 8 (▲ - ▲) y 10 (△ - △) se incubaron con esferas de látex (1:100) de 7.5 μ m de diámetro a 37°C. A los 30 y 60 min las preparaciones se fijaron con glutaraldehído, se lavaron con PBS y las esferas ingeridas se contaron en el microscopio óptico en 100 amibas al azar. Se obtuvieron promedios de esferas por amiba para cada tiempo.



Actividad de lectina de las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos.

Kobiler y Mirelman (1981), describieron la presencia de una actividad de lectina en E. histolytica, basados en que los extractos amibianos producen fuerte aglutinación de eritrocitos. Esta actividad puede estar implicada en la adhesión de las amibas a los eritrocitos humanos. Una posibilidad sería que las clonas obtenidas de la subpoblación SA 2⁻, estuvieran afectadas en los factores responsables de esta actividad aglutinante, por tanto era importante medir la actividad de lectina de las clonas deficientes en adhesión y compararla con la de la cepa silvestre.

La actividad de lectina se determinó por hemaglutinación de eritrocitos humanos y se reportó como la inversa de la dilución más alta de los extractos amibianos que produjo aglutinación de eritrocitos humanos. En la tabla II, se muestra que las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos humanos fueron también deficientes en actividad de lectina, ya que el título más alto de aglutinación se presentó en los extractos de la clona 8 y fue de 16. En cambio, en la cepa silvestre HM1:IMSS fue de 128. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la lectina amibiana participa en la adhesión de la amiba a eritrocitos humanos, tal como fue reportado previamente por Kobiler y Mirelman (1981), ya que esta lectina se encuentra disminuída en las clonas deficientes en adhesión.

TABLA II.

ACTIVIDAD DE LECTINA DE CLONAS
DEFICIENTES EN ADHESION.

CLONA	* T/A
HM1:IMSS	128
4	12
5	1
8	16
10	8

* Inversa de la dilución más
alta que produjo aglutinación.

Diluciones binarias desde 1:2 hasta 1:512 de los extractos crudos amibianos en solución amortiguadora de hemaglutinación (Materiales y Métodos), se incubaron con eritrocitos humanos fijados con glutaraldehído al 2.5 %, durante 1 h a temperatura ambiente. El título de aglutinación (T.A.) se midió como la inversa de la dilución más alta que produjo aglutinación de los eritrocitos.

Adhesión y efecto citopático sobre células epiteliales en cultivo.

Los trofozoítos amibianos se adhieren a un gran número de células de diferente tipo, desde bacterias hasta células de mamífero; estas últimas incluyen desde eritrocitos hasta células epiteliales. Sin embargo, no se sabe si en la amiba existe más de una adhesina o si la adhesión de los trofozoítos a los diferentes tipos de células está dada por la misma molécula.

Para definir esto, se probó si las clonas obtenidas a partir de la subpoblación SA 2⁻ presentaban, también, deficiencia para adherir células epiteliales de la línea MDCK. Los trofozoítos de las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos humanos se incubaron por 15 min con las células MDCK fijadas con glutaraldehído, como ya se describió en la sección de Materiales y Métodos. La tabla III muestra que las clonas deficientes en adhesión, presentaron también deficiencia para adherirse a las células epiteliales, pues mientras que la cepa silvestre HM1:IMSS presentó un 80% de adhesión, las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos tuvieron un porcentaje de adhesión del 45, 35 y 30%, lo que indica que adhirieron alrededor del 50% menos que la cepa silvestre.

Por otra parte, en la misma tabla III, se muestra que el efecto citopático sobre las células epiteliales de la

TABLA III

ADHESION Y EFECTO CITOPATICO SOBRE CELULAS
EPITELIALES EN CULTIVO.

CLONA	% ADHESION	% EFECTO CITOPATICO
HM1:IMSS	80 ± 8	100
4	35 ± 7	45 ± 10
5	30 ± 9	42 ± 12
8	45 ± 10	48 ± 6
10	30 ± 10	35 ± 8

Monocapas celulares de la línea MDCK se incubaron con trofozoítos de las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos en una relación 1:1. La adhesión se llevó a cabo durante 10 min a 37°C y el efecto citopático 1 h a 37°C como ya se describió en Materiales y Métodos. Se obtuvieron los porcentajes respectivos.

línea MDCK por las clonas deficientes en adhesión fue significativamente menor que el que mostró la cepa silvestre. Todas las clonas presentaron un porcentaje de destrucción de las monocapas menor del 50%. Estos resultados sugieren que, para que se lleve a cabo la destrucción eficiente de las monocapas celulares por los trofozoítos amibianos, es necesario que la adhesión se realice eficientemente. Esto apoya los datos reportados en relación a que la adhesión es un fenómeno previo a la destrucción de la célula blanco (Ravdin y col. 1980; Orozco, 1981).

Virulencia de las clonas deficientes en adhesión.

Como se sabe, la virulencia de las cepas amibianas es un fenómeno determinado por una serie de factores y propiedades de superficie, algunas de las cuales han sido estudiadas por diferentes autores (Trissl y col.; 1977; Kobilier y Mirelman, 1981; Orozco, 1981). En particular, como se dijo anteriormente, la presencia de lectinas, la adhesión y la eritrofagocitosis se han relacionado directamente con la virulencia "in vivo" de los trofozoítos. A partir de estas consideraciones se esperaba que las clonas deficientes en adhesión, fagocitosis y actividad de lectina, presentaran también deficiencia para producir abscesos en animales de experimentación. Por tanto, se procedió a caracterizar la virulencia "in vivo" de las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos. Esta se midió por inoculación intraportal de los trofozoítos en hámsteres jóvenes. A los 8 días post-inoculación, los hámsteres se sacrificaron, se extrajo el

TABLA IV.

VIRULENCIA DE CLONAS DEFICIENTES EN ADHESION A
ERITROCITOS HUMANOS.

CEPA	HAMSTERES CON ABSCESO		%	CARACTERISTICAS DE LOS ABSCESOS
	HAMSTERES INOCULADOS			
HM1:IMSS	9/10		90	Generalizados
4	5/6		83	2 generalizados 3 microabscesos
5	3/5		60	2 generalizados 1 microabsceso
8	2/6		30	2 microabscesos
10	3/6		50	1 generalizado 2 microabscesos

Para medir la virulencia de las clonas, 2.5×10^5 trofozoítos se inocularon intraportalmente en hámsteres. Los animales se sacrificaron a los 8 días, se extrajo el hígado y se registró el porcentaje de animales con abscesos hepáticos, así como sus características. Se inocularon 10 hámsteres con la cepa silvestre y 5 o 6 con las clonas deficientes en adhesión.

hígado y los abscesos se cuantificaron tomando en cuenta su cantidad y tamaño, clasificándose arbitrariamente como abscesos generalizados cuando cubrieron gran parte de la superficie del hígado, en abscesos medianos los que cubrían pequeñas porciones de hígado, pequeños, los que a simple vista se observaban como puntos de infección; y microabscesos, los que sólo con lente de aumento fue posible localizarlos.

En la tabla IV se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de virulencia para cada una de las clonas deficientes en adhesión. La cepa silvestre Hm1:IMSS, produjo abscesos generalizados en las tres cuartas partes del hígado y el 90% de los hámsteres inoculados presentaron abscesos hepáticos amibianos. Las clonas deficientes en adhesión, mostraron en general menor número de abscesos y en menor número de animales, aunque se obtuvieron algunos generalizados, pero en su mayoría fueron microabscesos. Sin embargo, en la clona 4 el 83% de los hámsteres presentaron abscesos, aunque éstos fueron en su mayoría microabscesos.

En conclusión, las clonas deficientes en adhesión obtenidas en el presente trabajo, aisladas a partir de la cepa silvestre Hm1:IMSS, resultaron ser deficientes también en eritrofagocitosis, en el efecto citopático sobre monocapas en cultivo y en virulencia, lo cual indica que existe una relación directa entre la adhesión y la virulencia. Estas clonas también resultaron ser deficientes en la actividad de lectina, lo que sugiere que las moléculas responsables de esta actividad, participan en la adhesión a la célula blanco.

Interacción con bacterias.

Se ha sugerido que las bacterias juegan un papel importante en el cambio de conducta de los trofozoítos de E. histolytica de no invasivos a invasivos y viceversa. Esta hipótesis es apoyada por los estudios de varios investigadores, quienes han encontrado que la virulencia de las cepas amibianas se incrementa cuando los trofozoítos se cultivan por períodos largos con cierto tipo de bacterias (Westphal, 1937; Wittner y Rosebaum, 1970; Bos y Hage 1975). No se sabe a qué se debe esta capacidad de algunas bacterias para aumentar la virulencia amibiana. Una posibilidad podría ser que las bacterias, al adherirse a moléculas de la superficie de la amiba, estimulen su fagocitosis o su actividad lítica, o bien que, al ser ingeridas por los trofozoítos, les proporcionen a éstos ciertos metabolitos que activen algunas funciones relacionadas con la virulencia. Además las amibas cultivadas axénicamente, al asociarse con bacterias por períodos cortos, incrementan su virulencia. Bracha y Mirelman, (1984), reportaron que la incubación de trofozoítos de la cepa HMI:IMSS con bacterias E. coli cepa 055 por períodos de 30 min, aumentó la capacidad de aquellos para destruir monocapas celulares en cultivo. Sin embargo, no se sabe si este efecto es producido sólo sobre algunas cepas de E. histolytica, o si es un efecto generalizado. Tampoco se sabe si el efecto de las bacterias se reduce a la activación del efecto citopático de los trofozoítos, o también se activan la

critrofagocitosis, la virulencia "in vivo" y el efecto citotóxico de E. histolytica. Por tanto, es necesario realizar mayores estudios que ayuden a conocer los factores tanto de la bacteria como de los trofozoítos que participan en el proceso de activación de la virulencia amibiana.

Dosis absceso media.

Antes de estudiar el efecto de las bacterias sobre la virulencia "in vivo" de E. histolytica, se realizaron experimentos de inoculación intraportal de hámsteres con trofozoítos de varias cepas y clonas de E. histolytica, con el objeto de:

- a) Obtener datos que permitieran establecer la dosis absceso media de las cepas amibianas, y
- b) Para conocer si la producción de abscesos hepáticos amibianos en los hámsteres era dependiente del número de trofozoítos inoculados.

Para estos experimentos, se eligieron cepas y clonas con diferentes propiedades de virulencia:

- a) La cepa HML:IMSS que es altamente virulenta y fagocítica,
- b) La cepa HK9 de virulencia y fagocitosis atenuada, y
- c) La clona L-6 avirulenta y deficiente en fagocitosis (Tabla V).

Los resultados de los experimentos de medición de la virulencia "in vivo", fueron reproducibles e inesperados. Se ha descrito que se requieren 2.5×10^5 trofozoítos de la

TABLA V.

PROPIEDADES DE VIRULENCIA Y ORIGEN DE VARIAS CEPAS Y CLONAS DE E. histolytica.

CEPA	ADHESION	FAGOCITOSIS	VIRULENCIA	DATOS DE AISLAMIENTO	REFERENCIA
Hm1:IMSS	eficiente	eficiente	alta	disentería	De la Torre y col. (1971)
Clona A	eficiente	eficiente	alta	de Hm1:IMSS	Orozco (1981)
Clona L-6	eficiente	deficiente	avirulenta	de Hm1:IMSS	Orozco (1981)
Clona 23	deficiente	deficiente	atenuada	de Hm1:IMSS	Rodríguez (1985)
HK9:NIH	eficiente	deficiente	atenuada	disentería	Diamond (1968)

cepa HMI:IMSS, para lograr producir abscesos hepáticos en el 100% de los hámsteres inoculados (Tsutsumi y col., 1984; Orozco y col., 1985). Los resultados obtenidos de los experimentos realizados en esta tesis, corroboraron lo anterior. Sin embargo, se encontró que con inóculos tan bajos como 1.25×10^3 trofozoítos de la cepa HMI:IMSS el 25% de los animales inoculados presentaron abscesos hepáticos y con 1.25×10^4 , se presentaron abscesos en el 79% de los animales (Fig. 7). Lo sorprendente de estos experimentos fue que cuando se inocularon 2×10^4 trofozoítos por hámster, es decir un orden de magnitud más que el necesario para dar abscesos en el 79% de los animales, el porcentaje de animales que desarrollaron abscesos hepáticos bajó hasta 12%, para subir de nuevo a 28% cuando se utilizaron 5×10^4 trofozoítos y a 58% con 10^5 . A partir de este último inóculo, el número de animales que presentaron abscesos, aumentó hasta llegar al 90%; este porcentaje se alcanzó cuando se inocularon 2.5×10^5 trofozoítos en cada uno de los animales. Estos resultados muestran un comportamiento bimodal, de los que se pueden obtener cuando menos dos dosis absceso medias, una con un inóculo de 5×10^3 trofozoítos y la otra con 8.5×10^4 trofozoítos, también se observan dos picos de alta agresividad, uno con 1.25×10^4 trofozoítos y la otra con 8.5×10^4 trofozoítos. Este comportamiento bimodal mostró dos picos de alta agresividad, uno con inóculo de 1.25×10^4 y el otro con 2.5×10^5 trofozoítos y se determinaron cuando menos dos dosis absceso medias, una con un inóculo de 5×10^3

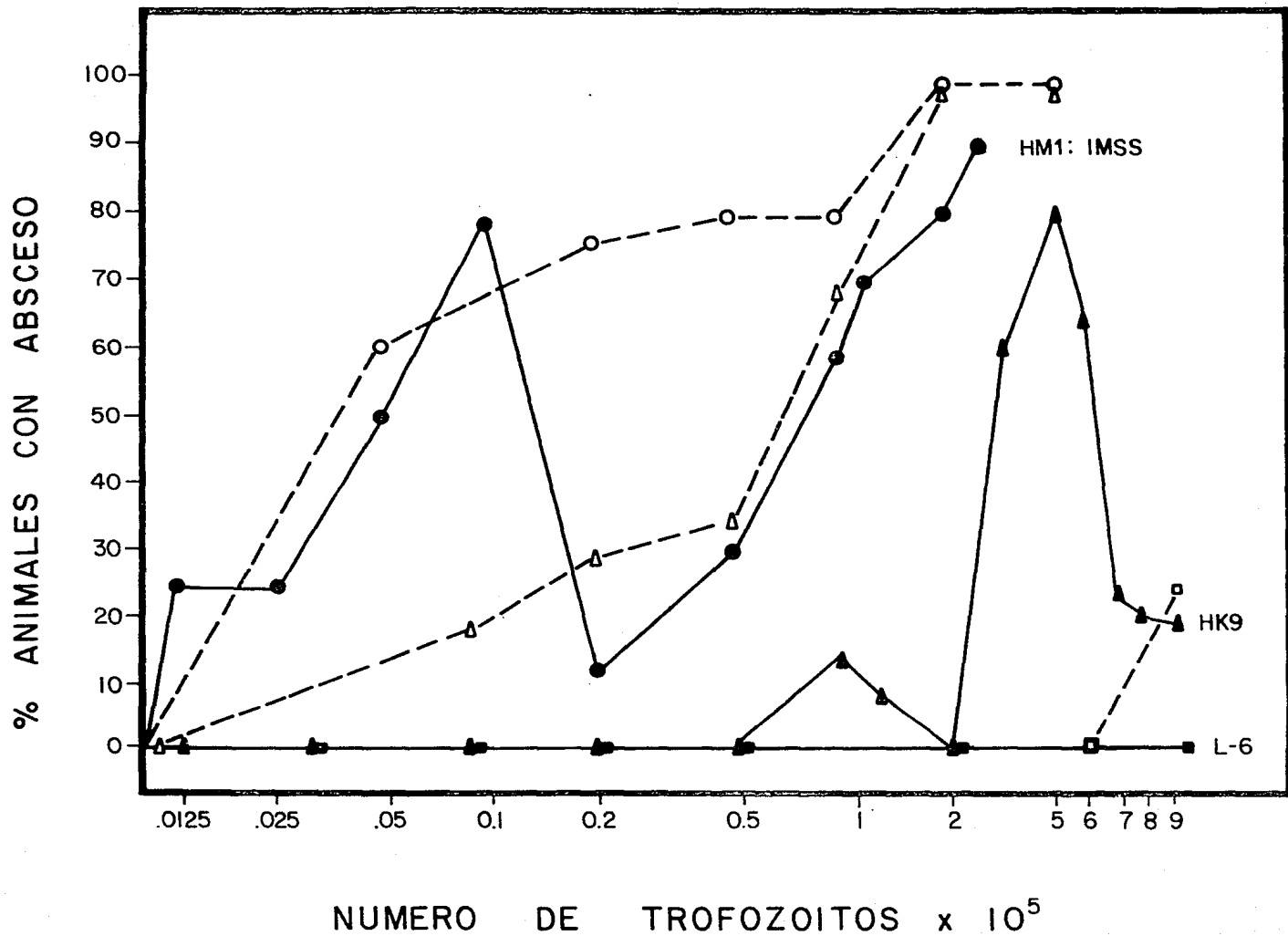
y la otra con 8.5×10^4 trofozoítos. Los abscesos producidos por los trofozoítos de la cepa HMI:IMSS, fueron grandes o generalizados, de acuerdo a la nomenclatura que se estableció previamente.

La curva bimodal que se obtuvo cuando se graficaron los resultados de los experimentos realizados con la cepa HMI:IMSS, se repitió con la cepa HK9, aunque los inóculos utilizados para esta cepa fueron mayores (Fig. 7). Cuando se inocularon 9×10^4 trofozoítos de la cepa HK9, el 12% de animales dieron abscesos y, cuando se aumentó el número de trofozoítos a 2×10^5 , ningún animal presentó abscesos. A partir de este inóculo, el número de animales con abscesos hepáticos amibianos aumentó. Así, utilizando 3×10^5 trofozoítos, el 60% de los animales presentaron abscesos y con 5×10^5 trofozoítos, el 80%. Al aumentar el inóculo a 6, 7, 8 y 9×10^5 trofozoítos, el porcentaje bajó linealmente otra vez, reproduciéndose los datos de los experimentos realizados con la cepa HMI:IMSS. Como se puede observar, también se obtuvieron dos picos de agresividad para la cepa HK9, con inóculos de 9×10^4 y 5×10^5 trofozoítos por animal y dos dosis absceso medias con inóculos de 3×10^5 y 6.3×10^5 trofozoítos. En la mayoría de los casos, los abscesos originados por los trofozoítos de la cepa HK9 fueron medianos, pequeños o puntuales.

En la misma figura se observa que los trofozoítos de la clona L-6 no produjeron abscesos, aún cuando se utilizaron

FIGURA 7.

Activación de la virulencia mediada por bacterias de las cepas Hm1:IMSS, HK9 y de la clona L-6. Diferentes inóculos de trofozoítos de la cepa Hm1:IMSS (● - ●), HK9 (▲ - ▲) y de la clona L-6 (■ - ■), se inocularon en hámsteres jóvenes para determinar la virulencia y las dosis absceso medias. Posteriormente, los mismos trofozoítos se incubaron con bacterias E. coli irradiadas hasta completa inactivación en relación de 1:1000 durante 30 min a 37°C. Al término de este tiempo, los trofozoítos se inocularon en hámsteres por vía intraportal y, a los 8 días post-inoculación, se sacrificaron y se extrajo el hígado para valorar los abscesos y se obtuvo el porcentaje de animales con abscesos. Hm1:IMSS (○ - ○), HK9 (△ - △), y L-6 (□ - □).



inóculos hasta de 9×10^5 trofozoítos por hámster; por tanto, no fue posible obtener la dosis absceso media con los inóculos probados.

Efecto de las bacterias sobre la virulencia "in vivo".

Con el objeto de estudiar el efecto de las bacterias E. coli cepa 055 sobre la virulencia de los trofozoítos de las cepas HM1:IMSS y HK9, así como de la clona L-6, los trofozoítos se preincubaron con bacterias irradiadas, antes de inocularse intraportalmente a los animales.

En la figura 7 se muestra que cuando los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS se preincubaron con bacterias irradiadas, la virulencia de esta cepa se incrementó en forma lineal, a partir de inóculos de 5×10^4 trofozoítos, hasta llegar al 100% de hámsteres con absceso a partir de inóculos de 2×10^5 trofozoítos. Los picos de virulencia no aparecen, sino que se aprecia una gráfica lineal con una meseta que se inicia aproximadamente con inóculos de 2×10^5 trofozoítos.

En la misma figura se observa que al interaccionar previamente los trofozoítos de la cepa HK9 con bacterias, también la virulencia de esta cepa se incrementó linealmente. Las bacterias aumentaron la capacidad de los trofozoítos para producir abscesos a partir de 1×10^4 trofozoítos, ya que al incrementar el inóculo hasta 2×10^5 , el porcentaje de hámsteres con abscesos fue mayor hasta llegar al 100%. De nuevo, el comportamiento bimodal se hizo lineal y se obtuvo una curva creciente con una meseta.

Los trofozoítos de la clona L-6, indujeron abscesos pequeños en el 25% de los animales inoculados con 9×10^5 trofozoítos preincubados con bacterias.

Estos resultados, aunque son difíciles de interpretar, son de interés porque por primera vez se demuestra que la virulencia de los trofozoítos es directamente dependiente del inóculo, sólo en presencia de bacterias. En cambio, para la clona L-6 no fue posible determinar la dosis absceso media, dado que con inóculos tan altos como 1×10^6 trofozoítos, no se produjeron abscesos en ninguno de los animales inoculados.

Efecto de las bacterias en la adhesión.

Con el objeto de definir si las bacterias aumentaban la eficiencia de adhesión de los trofozoítos a la célula blanco, probablemente actuando como puente y que este incremento en la eficiencia de adhesión fuera el responsable de la activación de la virulencia de la amiba, los trofozoítos de la cepa HMI:IMSS virulenta y de la cepa HK9 de escasa virulencia, se preincubaron con bacterias y se midió su eficiencia de adhesión a eritrocitos humanos. Como se observa en la Tabla VI no se detectó ningún efecto significativo de las bacterias sobre la eficiencia de adhesión.

Efecto de las bacterias en la eritrofagocitosis.

Puesto que la eritrofagocitosis es una propiedad biológica de los trofozoítos, la cual participa directamente en la virulencia de las cepas, se midió el efecto de la

TABLA VI.

EFFECTO DE LAS BACTERIAS SOBRE LA ADHESION
DE E. histolytica A ERITROCITOS.

CEPA	E/A	E/A (preincubación c/bacterias)
HM1:IMSS	8 ± 2	9 ± 2
HK9	8 ± 1	10 ± 1

E/A = eritrocitos/amiba.

Adhesión = 5 min, 0°C.

Se midió la adhesión a eritrocitos humanos de los trofozoítos de dos cepas de E. histolytica de diferente virulencia, de acuerdo a la técnica descrita en Materiales y Métodos, previa interacción de los trofozoítos con bacterias en relación de 1:1000 durante 30 min a 37°C. Los datos de la primera columna, indican la adhesión y, los de la segunda columna la adhesión, previa interacción con bacterias.

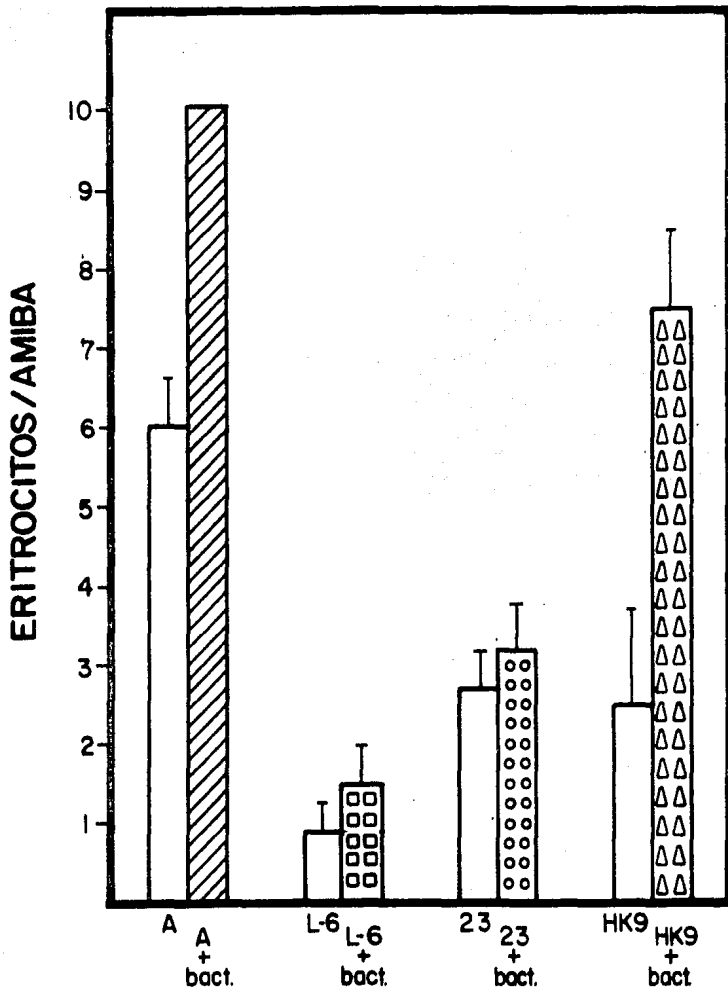
asociación de las bacterias con cepas y clonas amibianas con diferentes fenotipos de adhesión, fagocitosis y virulencia. Se utilizaron trofozoítos de E. histolytica de la cepa HK9 de virulencia atenuada y baja fagocitosis, de la clona A aislada a partir de HMI:IMSS altamente virulenta y fagocítica, la clona L-6 avirulenta y deficiente en fagocitosis, también aislada de HMI:IMSS y la clona 23, la cual es deficiente en adhesión y por consiguiente en fagocitosis, efecto citopático y virulencia (Tabla V). Para estos ensayos, los trofozoítos se incubaron con bacterias E. coli de la cepa CR34 en relación de 1:1000, durante 30 min a 37°C y, al término de este tiempo, se adicionaron eritrocitos humanos y se continuó la incubación durante 5 min a 37°C, para permitir la eritrofagocitosis. Como control, los trofozoítos de las mismas cepas y clonas, se trataron exactamente igual, pero sin agregar las bacterias.

Al incubarse previamente los trofozoítos con bacterias su actividad eritrofágica se activó, como se demuestra en la figura 8. La clona A virulenta y la cepa HK9 de virulencia atenuada, fueron las que mostraron mayor aumento en su fagocitosis. La clona A virulenta, fagocitó en promedio 6 eritrocitos/amiba y, al interaccionar previamente con bacterias, los trofozoítos fagocitaron 10 eritrocitos/amiba, lo que indica que hubo un aumento en la fagocitosis del 66%. La cepa HK9 de escasa virulencia, ingirió 2.5 eritrocitos/amiba y cuando se preincubó con bacterias aumentó a 7.5,

FIGURA 8.

Activación de la eritrofagocitosis mediada por bacterias de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23.

Trofozoítos de la cepa HK9 ($\Delta - \Delta$), de la clona A ($/// - ///$), de la clona L-6 ($\square - \square$) y de la clona 23 ($O - O$), interaccionaron previamente con bacterias E. coli de la cepa CR34 (1:1000) durante 30 min a 37°C. Posteriormente se incubaron con eritrocitos humanos (1:100) durante 5 min a 37°C; al término de este tiempo, se agregó agua bidestilada para lisar los eritrocitos no ingeridos, las preparaciones se fijaron con glutaraldehído y los eritrocitos se contrastaron con diaminobencidina. Se contaron eritrocitos ingeridos en 100 amibas al azar y se obtuvo el porcentaje de activación de la eritrofagocitosis. Las barras claras indican la eritrofagocitosis de los trofozoítos sin haber interaccionado previamente con bacterias.



CEPA O CLONA 4×10^5 TROFOZOITOS

indicando un aumento del 200% en la fagocitosis. La clona L-6 avirulenta, fagocitó en promedio 0.8 eritrocitos/amiba y al contacto previo con las bacterias, mostró poco aumento ya que fagocitó 1.5 eritrocitos/amiba, la clona 23 deficiente en adhesión a eritrocitos y a bacterias fue la que menor activación presentó en comparación con el resto de las cepas y clonas probadas, ya que fagocitó 2.7 eritrocitos/amiba y, al interaccionar previamente con bacterias, la fagocitosis aumentó a un máximo de 3.2 eritrocitos/amiba.

Los resultados anteriores, indican que algunas cepas bacterianas de E. coli son capaces de activar la eritrofagocitosis de cepas y clonas de E. histolytica. Esta activación se produjo tanto en las cepas virulentas como en las de escasa virulencia. Sin embargo, la activación de la eritrofagocitosis fue mayor en la cepa HK9 y menor en la clona 23; esta última fue seleccionada por su deficiencia para ingerir bacterias E. coli, lo que podría sugerir que la adhesión específica de las bacterias a la superficie de la amiba juega un papel importante en la activación de la fagocitosis.

Efecto citopático de los trofozoítos en interacción con bacterias.

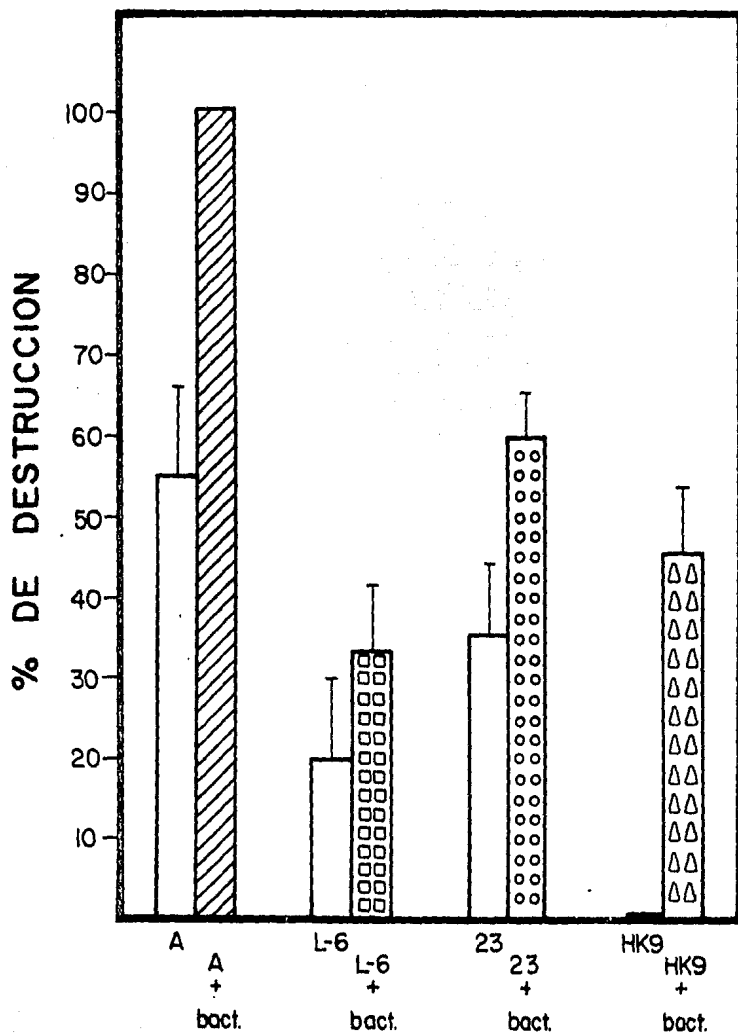
El modelo de cultivos de células epiteliales de la línea MDCK es adecuado para medir en forma cuantitativa la virulencia de las amibas. Varios investigadores han descrito

una relación directa entre la agresividad de las cepas amibianas y la capacidad de éstas para destruir monocapas de células en cultivo (Knigh 1977; Orozco y col. 1978; Ravdin y col. 1980). En esta tesis se midió la velocidad de destrucción de la monocapa de células epiteliales de la línea MDCK, producida por los trofozoítos de las cepas HK9 y de las clonas A, L-6 y 23 provenientes de la cepa Hm1:IMSS, antes y después de incubarlos con bacterias. En la figura 9 se presentan los resultados de la destrucción de las monocapas celulares originada por los trofozoítos de las diferentes cepas. La agresividad de los trofozoítos reportada para cada una de las cepas y clonas probadas, sin incubarse previamente con bacterias, se confirmó. La clona A, virulenta, presentó mayor capacidad para destruir monocapas celulares, la cepa HK9, de escasa virulencia, prácticamente no destruyó la monocapa al inóculo probado, la clona 23, deficiente en adhesión, produjo un porcentaje de destrucción menor que la clona A, pero mayor que la clona L-6 y la clona L-6, avirulenta, mostró poco porcentaje de destrucción.

En la figura 9 se observa también el efecto de las bacterias E. coli de la cepa CR34 sobre la capacidad de los trofozoítos para destruir monocapas celulares. La monocapa que mostró mayor destrucción, se tomó como 100% de efecto de destrucción; en este caso fue la clona A previamente incubada con bacterias. Por tanto, en base a este porcentaje se calcularon los datos del resto de las cepas y clonas probadas.

FIGURA 9.

Activación del efecto citopático mediado por bacterias de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23. 1×10^5 trofozoítos de la cepa HK9 ($\Delta - \Delta$) y de las clonas A ($/// - ///$), L-6 ($\square - \square$) y 23 ($0 - 0$), previamente interaccionaron con bacterias E. coli de la cepa CR34 (1:1000) durante 30 min a 37°C ; al término de este tiempo los trofozoítos se lavaron y se incubaron con las monocapas celulares de la línea MDCK durante 2 o 3 h a 37°C . Se midió el grado de destrucción de la monocapa, como se indica en Materiales y Métodos y se obtuvo el porcentaje de destrucción de las monocapas celulares. Las barras claras indican la actividad citopática de los trofozoítos solos. La monocapa que presentó mayor destrucción, se tomó como 100% de efecto destructivo.



CEPA O CLONA 1×10^5 TROFOZOITOS

La clona A sin interaccionar previamente con bacterias y utilizando un inóculo de 1×10^5 trofozoítos destruyó el 55% de la monocapa, en comparación con el mismo número de trofozoítos preincubados con bacterias, que aumentaron su capacidad destructiva hasta 100%. La clona L-6 presentó 20% de destrucción de la monocapa celular, pero al interaccionar previamente con bacterias, este porcentaje aumentó a 33% de destrucción. La clona 23 sin haber interaccionado previamente con bacterias, destruyó el 35.5% de las monocapas y los trofozoítos de la misma clona que interaccionaron con bacterias, destruyeron el 60%. La cepa HK9, no indujo actividad citopática con este inóculo. Sin embargo, al preincubar los trofozoítos de esta cepa con bacterias, éstos se activaron y destruyeron el 45.5% de la monocapa celular. La cepa HK9 y la clona A, fueron las que mayormente se activaron. Estos resultados nos demuestran que la interacción de los trofozoítos con bacterias por tiempos cortos, activa la capacidad de éstos para destruir las monocapas celulares, tanto de clonas altamente virulentas, como las de virulencia atenuada.

"Actividad de toxina" de los extractos amibianos en interacción con bacterias.

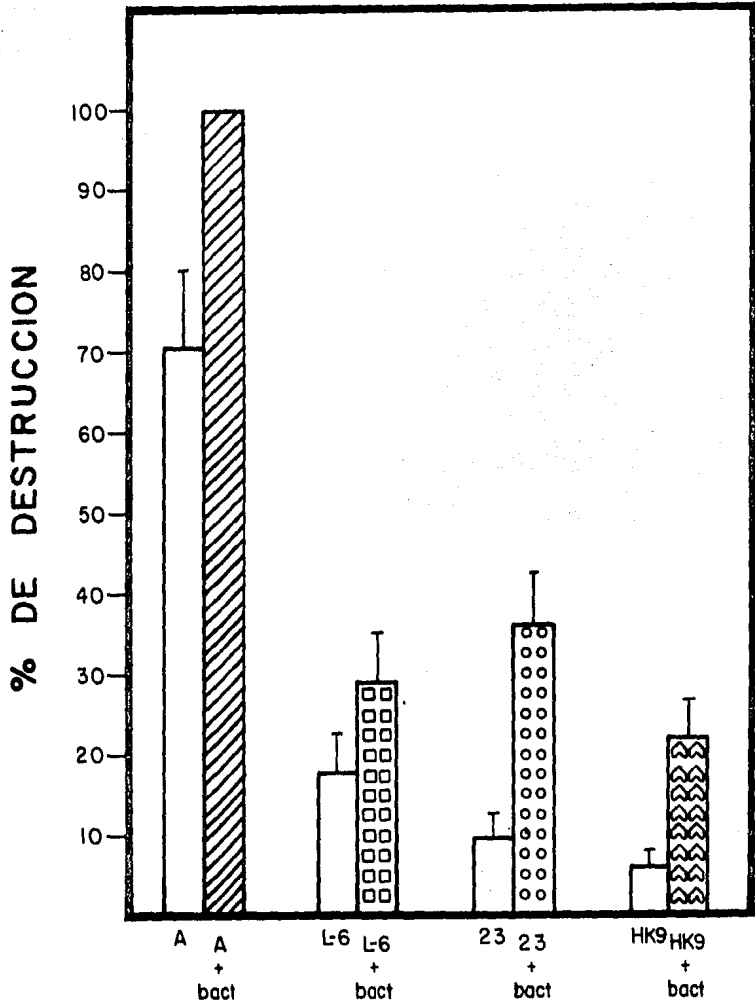
Para determinar si las bacterias tenían algún efecto sobre la "actividad de toxina" de los extractos amibianos, se midió el efecto de los extractos celulares de trofozoítos de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23, preincubados por

30 min con bacterias sobre monocapas celulares de la línea MDCK. Los cálculos de los porcentajes se realizaron tomando en cuenta como 100% de destrucción de la monocapa, a la que presentó mayor destrucción, en cuyo caso fue la que estuvo en contacto con extractos de trofozoítos de la clona A incubados con bacterias.

La figura 10 muestra que todas las cepas y clonas aumentaron su "actividad citotóxica" cuando se preincubaron con bacterias. La clona A con fenotipo virulento fue la que mayor "actividad citotóxica" presentó, en comparación con el resto de las cepas y clonas probadas. Los extractos de los trofozoítos de la clona A sin preincubar con bacterias destruyeron el 70% de la monocapa de células epiteliales y, cuando los extractos se obtuvieron después de que los trofozoítos se incubaron con bacterias, produjeron 100% de destrucción. Los extractos celulares de la cepa HK9, fueron los que tuvieron menor capacidad para destruir monocapas celulares en cultivo, ya que sólo destruyeron el 5% de la monocapa, pero al preincubar los trofozoítos con bacterias, la capacidad destructiva de sus extractos aumentó a 22%. La clona L-6 avirulenta, sin haber estado en contacto con bacterias, presentó 18% de destrucción de la monocapa, sin embargo, al preincubar los trofozoítos con bacterias, los extractos celulares destruyeron el 29% de la monocapa. La clona 23 deficiente en adhesión, mostró una "actividad citotóxica" del 9.5% y la incubación de los trofozoítos con bacterias previo al experimento, activó el efecto de los

FIGURA 10.

Activación del efecto citotóxico mediado por bacterias de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23. Los extractos amibianos de 1×10^6 trofozoítos de la cepa HK9 ($\triangle - \triangle$) y de las clonas A ($/// - ///$), L-6 ($\square - \square$) y 23 ($o - o$), interaccionaron previamente con bacterias E. coli de la cepa CR34 (1:1000) durante 60 min a 37°C . Posteriormente, los trofozoítos se lavaron y se obtuvieron los extractos amibianos, luego se agregaron a las monocapas celulares, se incubaron durante 3 a 5 h a 37°C y se midió el grado de destrucción de la monocapa como se indica en Materiales y Métodos. Las barras claras indican la actividad de toxina de los trofozoítos sin haber interaccionado con bacterias. La monocapa que presentó mayor destrucción, se tomó como 100 % de efecto citotóxico.



CEPA O CLONA 1×10^6 TROFOZOITOS

extractos amibianos, ya que éstas produjeron 36% de destrucción de la monocapa. Como se puede observar, las cepas y clonas probadas presentaron diferente capacidad de activación de sus extractos para destruir monocapas celulares en cultivo.

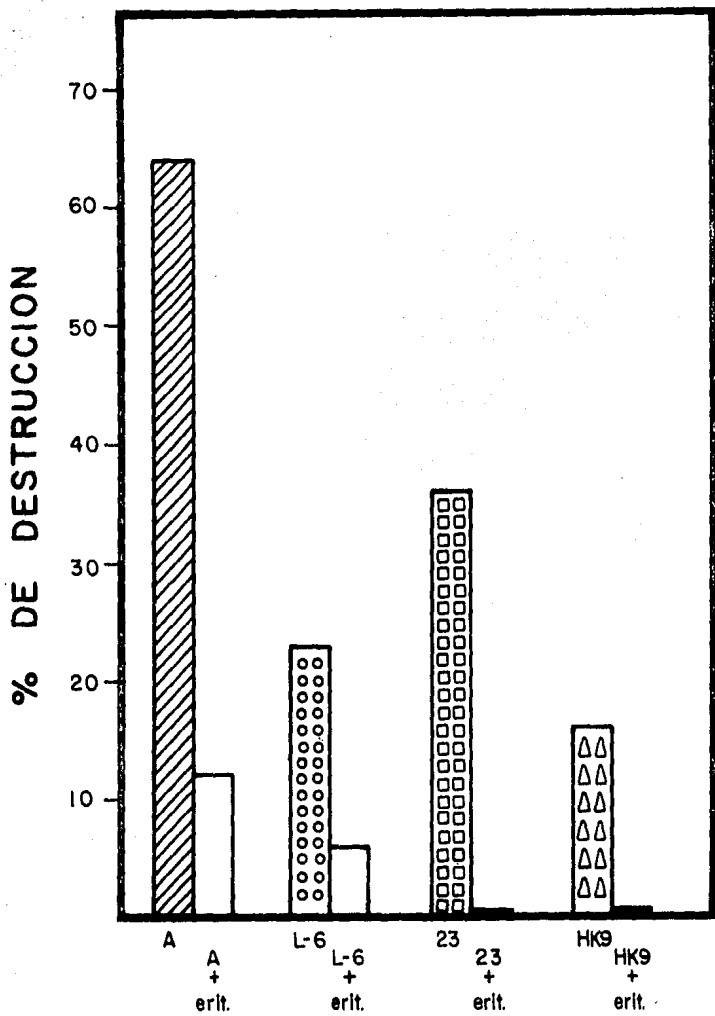
Efecto de los eritrocitos humanos en el efecto citopático y citotóxico.

Como control para definir si el efecto activador de las bacterias sobre la virulencia amibiana era específico, se utilizaron eritrocitos humanos en vez de bacterias en los experimentos de preincubación y se midió la actividad citopática y citotóxica sobre monocapas de células en cultivo de la línea MDCK, como ya se describió anteriormente en Materiales y Métodos.

Como se demuestra en la Figura 11, los eritrocitos no aumentaron el efecto citopático de los trofozoítos, sino que lo disminuyeron o lo inhibieron. La clona A, sin haber interaccionado con eritrocitos, mostró 64% de destrucción de la monocapa y, al interaccionar previamente con eritrocitos humanos, este porcentaje disminuyó hasta 12%, la clona L-6, de igual manera destruyó el 24 % de la monocapa celular y, al contacto previo con eritrocitos, el porcentaje bajó hasta hasta 6%. Al medir el efecto citopático de la clona 23, se notó destrucción del 36% de la monocapa celular, pero al incubarse previamente los trofozoítos con los eritrocitos

FIGURA 11.

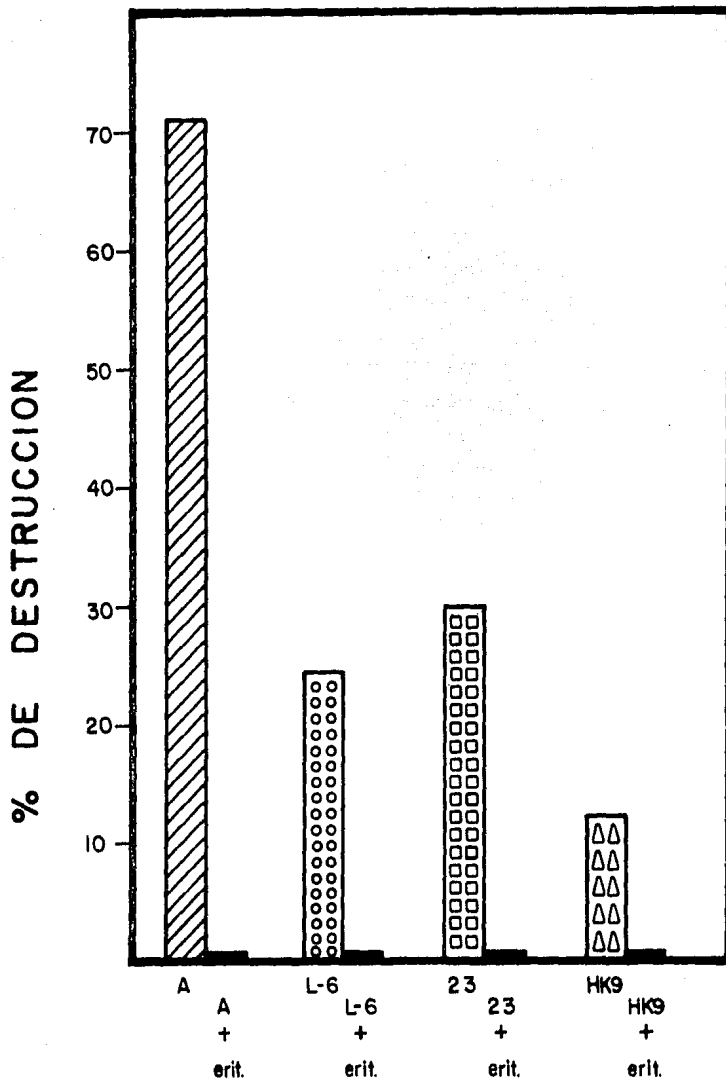
Efecto citopático de los trofozoítos de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23 en interacción con eritrocitos humanos. Se midió la citopatogenicidad sobre monocapas de células en cultivo de 1.5×10^5 trofozoítos de la cepa HK9 ($\Delta - \Delta$) y de las clonas A ($/// - ///$), L-6 ($O - O$) y 23 ($\square - \square$); simultáneamente, trofozoítos de las mismas cepas se incubaron con eritrocitos humanos en relación de 1:100 durante 30 min a 37°C , posteriormente los trofozoítos se incubaron con las monocapas celulares durante 2 o 3 h y se midió el grado de destrucción de la monocapa como se indica en Materiales y Métodos.



CEPA 0 CLONA 2×10^5 TROFOZOITOS

FIGURA 12.

Efecto citotóxico de los extractos amibianos de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23 en interacción con eritrocitos humanos. Se midió la actividad de toxina sobre monocapas de células epiteliales de 2×10^5 trofozoítos de la cepa HK9 ($\Delta - \Delta$) y de las clonas A ($/// - ///$), L-6 ($O - O$) y 23 ($\square - \square$); al mismo tiempo, se midió el efecto de los eritrocitos sobre esta actividad, incubando previamente los trofozoítos con los eritrocitos durante 60 min en relación de 1:100 durante 30 min, como ya se indicó en la sección de Materiales y Métodos.



CEPA 1.5×10^6 TROFOZOITOS

humanos, este efecto se inhibió, ya que presentó 0% de destrucción, la cepa HK9 mostró un efecto semejante, puesto que destruyó 16 % de la monocapa celular y la incubación con eritrocitos inhibió completamente la destrucción.

En la figura 12 se demuestra la actividad citotóxica de los extractos amibianos, probados al interaccionar previamente con eritrocitos humanos. La cepa HK9 y las clonas A, L-6 y 23, con diferentes propiedades de virulencia (Tabla V) no activaron su efecto citotóxico, sino que lo suprimieron totalmente, indicando 0% de destrucción de las monocapas celulares, después de haber estado en contacto los trofozoítos con los eritrocitos.

En conclusión, se obtuvieron dos dosis absceso medias para la cepa HMI:IMSS virulenta y la cepa HK9 de virulencia atenuada, simultáneamente se mostraron dos picos de agresividad para ambas cepas, aunque para la cepa HK9 se requirieron inóculos mayores. Por otro lado, al ampliar los estudios del efecto de las bacterias sobre los trofozoítos se encontró que éstas no sólo aumentan la virulencia y el efecto citopático, sino también la eritrofagocitosis y el efecto citotóxico; sin embargo, la adhesión de eritrocitos no es activada por las bacterias. La activación del efecto citopático y del efecto citotóxico es específico de las bacterias, puesto que los eritrocitos humanos no activaron estas características.

DISCUSION.

La virulencia de E. histolytica es un proceso multifactorial en el que participan una serie de propiedades biológicas y actividades tóxicas y enzimáticas del trofozoíto. Entre éstas destacan la adhesión, la fagocitosis y el efecto lítico sobre las células blanco (Orozco y col., 1982c; Chadee y Meerovitch, 1984; Tsutsumi y col., 1984; Chevez y col., 1974; Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1980). También se sabe que el medio ambiente juega un papel importante en la expresión de la agresividad de los trofozoítos. Entre estos factores que modulan la virulencia amibiana, se encuentra la flora bacteriana (Bos y Hage, 1975; Wittner y Rosebaum, 1970; Bracha y Mirelman, 1984). El primer paso en la expresión de la virulencia amibiana parece ser la adhesión de la amiba a la célula blanco, seguida de la colonización del tejido, la secreción de enzimas y/o toxinas que faciliten la invasión tisular, la citólisis y por último la fagocitosis. Algunos de estos pasos, se ven favorecidos y aumentados por la interacción de los trofozoítos con cierto tipo de bacterias, (Bracha y col., 1982; Bracha y Mirelman, 1984).

Puesto que la adhesión de los trofozoítos de E. histolytica a la célula blanco, es uno de los primeros pasos indispensables en la producción del daño celular, su estudio es de fundamental importancia en el conocimiento de los factores que participan en la virulencia amibiana

(Takeuchi y Phillips, 1975; Mora-Galindo y col., 1978; Ravdin y Guerrant, 1980; Orozco, 1981; Rodríguez, 1985).

Sin embargo, se ha sugerido que la adhesión es un factor secundario de virulencia, ya que es un evento indispensable pero no suficiente para que la amiba produzca el daño a la célula blanco. Esta sugerencia se obtuvo a partir del conocimiento de que cepas de diferente virulencia presentan eficiencia similar de adhesión (Orozco y col., 1985; Rodríguez y Orozco, 1986). Para estudiar el papel de la adhesión y la fagocitosis en la virulencia de los trofozoítos, en esta tesis se obtuvieron clonas de E. histolytica deficientes en adhesión y se estudiaron sus propiedades de virulencia para determinar si al afectar la adhesión se alteraba también la fagocitosis, el efecto citopático y la virulencia "in vivo" de los trofozoítos.

Uno de los problemas fundamentales para estudiar los factores de virulencia de la amiba, es que hasta hace poco tiempo la mayoría de los experimentos se realizaban con cepas heterogéneas de E. histolytica. La heterogeneidad de los cultivos de cepas amibianas (Orozco, 1981), pudiera deberse a que la mayoría de las cepas que se cultivan en el laboratorio fueron aisladas directamente de pacientes y no han sido clonadas, por lo tanto no se puede descartar la presencia de más de dos cepas en el cultivo.

Por otra parte, durante el cultivo axénico prolongado de las cepas amibianas se pueden haber producido mutaciones espontáneas en los trofozoítos, dando como resultado que cada una de las cepas que se utilizan en el laboratorio sea una mezcla de trofozoítos con diferentes fenotipos de virulencia, fagocitosis y otras propiedades. Por lo tanto, en esta tesis se puso especial énfasis en estudiar el efecto de la adhesión y la fagocitosis en clonas que fueron aisladas a partir de la cepa Hm1:IMSS de E. histolytica.

La estrategia utilizada para analizar el papel de la adhesión en la virulencia de E. histolytica fue el aislamiento de clonas mutantes espontáneas con deficiencia en adhesión. El método de selección de trofozoítos deficientes en adhesión a eritrocitos humanos, consistió en la separación de los trofozoítos que adhirieron pocos o ningún eritrocito, utilizando un gradiente discontinuo de ficoll. Los trofozoítos deficientes en adhesión se obtuvieron en las capas superiores del gradiente y se sometieron a una segunda selección. La eficiencia de la obtención de trofozoítos deficientes en adhesión aumentó al someter a los trofozoítos de la población SA 1⁻, al segundo tratamiento y obtener la población SA 2⁻. Esta población SA 2⁻, adhirió 50% del número de eritrocitos que adhirió la cepa silvestre Hm1:IMSS.

La subpoblación SA 2^m se clonó en agar semisólido, con el fin de obtener poblaciones homogéneas. La eficiencia de formación de colonias de esta subpoblación, fue ligeramente mayor que la de la cepa silvestre, lo cual nos indicó que este método resultó adecuado para el aislamiento de clonas deficientes en adhesión a eritrocitos humanos.

Estos resultados indican también que la eficiencia de formación de colonias en agar semisólido no correlaciona directamente con la virulencia de las cepas, como lo habían sugerido Gillin y Diamond (1978), puesto que los trofozoítos deficientes en adhesión y de escasa virulencia mostraron una alta EFC y clonas revertantes de L-6 virulentas presentaron baja EFC. Por otra parte, había sido reportado que revertantes virulentas obtenidas de la clona L-6 avirulenta, mostraron baja EFC, en comparación con la cepa silvestre HMI:IMSS (Orozco y col., 1983).

De la subpoblación clonada en agar semisólido se seleccionaron 20 clonas al azar, se cultivaron en medio líquido y se caracterizaron. El 20% de las clonas adhirieron menos del 50% de eritrocitos humanos, en comparación con la cepa silvestre. Sólo una de las clonas, la clona 6, presentó 70% de adhesión. Estos resultados indican que el método utilizado para obtener clonas de E. histolytica deficientes en adhesión, fue eficiente; y por primera vez se reporta un

método de aislamiento de clonas seleccionadas por su deficiencia en adhesión.

Recientemente, durante el desarrollo de este trabajo, Orozco y col., (1985), describieron el aislamiento de clonas de la cepa HMI:IMSS de E. histolytica deficientes en eritrofagocitosis. Entre éstas, algunas fueron deficientes en adhesión. Posteriormente, Rodríguez y Orozco (1986), obtuvieron por mutagénesis química de la clona A, un grupo de mutantes deficientes en eritrofagocitosis seleccionadas por el mismo método utilizado por Orozco y col., (1985). También en este grupo de mutantes deficientes en eritrofagocitosis, se encontraron algunas deficientes en adhesión. Los resultados de estos autores sugieren que uno de los factores que afectan a la fagocitosis de E. histolytica es la deficiencia de los trofozoítos para adherirse a la célula blanco. Sin embargo, para comprobar lo anterior, es necesario demostrar que todas las clonas deficientes en adhesión, son deficientes en fagocitosis. Para esto, resultó adecuado y eficiente el método de aislamiento directo de trofozoítos deficientes en fagocitosis reportado en esta tesis.

El grado de eritrofagocitosis de las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos humanos, fue menor que el de la cepa silvestre HMI:IMSS. A los 10 min de interacción, las clonas presentaron una deficiencia del 50% aproximadamente,

en comparación con la cepa silvestre, ya que esta última fagocitó 12 eritrocitos/amiba y las clonas obtenidas fagocitaron en promedio alrededor de 6 eritrocitos/amiba. Estos resultados dan evidencias de que la adhesión es un evento necesario para que se lleve a cabo la fagocitosis, lo cual corrobora lo sugerido por Orozco y col., (1982b) de que la adhesión específica es un evento indispensable para que la eritrofagocitosis se realice con eficiencia máxima.

Las relaciones de eritrocitos adheridos/eritrocitos fagocitados presentados por las clonas deficientes en adhesión, sugieren que la deficiencia en fagocitosis es debido a su deficiencia en adhesión y no a una deficiencia en la introducción de partículas en el citoplasma, puesto que mostraron una relación de eritrocitos adheridos/eritrocitos fagocitados menor que la cepa silvestre Hm1:IMSS. La clona 6 fue la única que mostró una relación mayor de 1 y su adhesión fue menor que la del resto de las clonas, por lo que se puede pensar que su deficiencia en fagocitosis está más en el proceso de ingestión que en el de adhesión.

Para mostrar una evidencia definitiva de que la deficiencia de eritrofagocitosis de las clonas deficientes en adhesión era debida a la incapacidad de los trofozoítos para adherir específicamente eritrocitos humanos, se realizaron los experimentos de fagocitosis de esferas de látex, las cuales carecen de receptores específicos. Los

resultados mostraron que las clonas deficientes en adhesión se comportaron en forma semejante a la cepa silvestre; esto es, fagocitaron un número semejante de esferas de látex. Esto era esperado, puesto que la fagocitosis de esferas de látex implica una adhesión inespecífica que no es mediada por receptores, sino por otro tipo de fuerzas, probablemente electrostáticas.

Se ha encontrado que en la superficie de los microorganismos hay proteínas con características semejantes a las lectinas, con especificidad de unión por ciertos carbohidratos y que dichas proteínas participan en la adhesión de los microorganismos patógenos a las células blanco. En E. histolytica se han descrito dos actividades de lectina, una de ellas sensible a la inhibición por oligómeros de N-acetilglucosamina (Kobiler y Mirelman 1980) y otra sensible a N-acetilgalactosamina (Ravdin y Guerrant 1981); por tanto, se determinó la "actividad de lectina" de las clonas amebianas deficientes en adhesión a eritrocitos humanos para ver si tenían afectada la molécula responsable de la actividad hemaglutinante y se encontró que todas las clonas deficientes en adhesión, fueron también deficientes en actividad de lectina. Estos resultados sugieren que las lectinas descritas por Kobiler y Mirelman (1981) y por Ravdin y col., (1981), podrían participar en la adhesión de la ameba a eritrocitos humanos; sin embargo, será necesario hacer experimentos de incubación con carbohidratos y

purificación de las lectinas para definir cuál de ellas, o si las dos están implicadas en la adhesión.

Posteriormente, se probó si las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos humanos, presentaban también deficiencia para adherir células epiteliales de la línea MDCK y se encontró que las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos, presentaron también deficiencia para adherirse a monocapas de células epiteliales, puesto que adhirieron 50% menos que la cepa silvestre. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la adhesina amibiana que participa en el contacto específico de los trofozoítos a eritrocitos humanos, participe también en la adhesión a células epiteliales.

Simultáneamente, mediante un ensayo rápido y sencillo para medir la agresividad de los trofozoítos "in vitro" se determinó el efecto citopático de las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos, sobre monocapas de células epiteliales de la línea MDCK (Orozco y col., 1978) y se encontró que todas las clonas deficientes en adhesión a eritrocitos presentaron un porcentaje de destrucción de las monocapas menor del 50% en comparación con la cepa silvestre HMI:IMSS; por lo que, con estos resultados se sugiere que, para que la destrucción de las monocapas se lleve a cabo eficientemente por los trofozoítos amibianos, se requiere que la adhesión de los trofozoítos a las monocapas de

células epiteliales, se lleve a cabo también eficientemente.

La virulencia de las cepas amibianas es un fenómeno determinado por varios factores y propiedades de superficie entre ellas la adhesión, la presencia de lectinas y la eritrofagocitosis se han correlacionado directamente con la virulencia de los trofozoítos; por tanto, se determinó la virulencia "in vivo", en hámsteres jóvenes de las clonas deficientes en adhesión y se encontró que la virulencia de las clonas estaba disminuída, ya que las deficientes en adhesión produjeron en general menor número de abscesos y en bajo número de animales de experimentación, los abscesos producidos por los trofozoítos de las clonas deficientes en adhesión, fueron en su mayoría microabscesos en comparación con la cepa silvestre HMI:IMSS, que produjo abscesos generalizados en las tres cuartas partes del hígado en el 90% de los hámsteres inoculados.

Estos resultados nos indican que existe heterogeneidad en los trofozoítos de la cepa HMI:IMSS en cuanto a su eficiencia de adhesión a eritrocitos humanos, ya que fue posible aislar subpoblaciones amibianas deficientes en adhesión. Por otra parte, se encontró que las clonas seleccionadas también resultaron ser deficientes en eritrofagocitosis, en su capacidad para destruir monocapas celulares en cultivo y en la actividad de lectina.

Es generalmente aceptado que la flora bacteriana tiene un papel fundamental en el establecimiento de la invasión intestinal por E. histolytica y en el mecanismo de agresión "in vitro" de este parásito. Varios autores, entre otros Wittner y Rosebaum (1970); Bos y Hage (1975); Bracha y Mirelman (1984), han encontrado que la virulencia de los trofozoítos de E. histolytica cultivados en medio axénico, se incrementa cuando éstos se reasocian con cierto tipo de bacterias. Por lo tanto, para ampliar los estudios sobre el efecto de las bacterias en la virulencia amibiana, en la segunda parte de esta tesis se hicieron experimentos de interacción de los trofozoítos con bacterias E. coli cepa CR34 o 055 y se estudió el efecto de esta asociación sobre diversas propiedades y actividades biológicas de varias cepas y clonas de E. histolytica, las cuales fueron seleccionadas por sus diferentes fenotipos de virulencia.

Como primera instancia, se determinó el efecto de las bacterias sobre la virulencia "in vivo" de los trofozoítos, para lo cual antes fue necesario obtener la dosis absceso media de cada una de las cepas utilizadas. Para tal efecto, se escogieron tres diferentes cepas de E. histolytica, la cepa HM1:IMSS, virulenta, la cepa HK9 de virulencia atenuada y la clona L-6, avirulenta y se inocularon intraportalmente en hámsteres jóvenes.

Los resultados de estos experimentos, corroboran que se requieren 2.5×10^5 trofozoítos de la cepa Hm1:IMSS para producir abscesos en el 90% de los hámsteres inoculados. Sin embargo, se encontró que con inóculos tan bajos como 1.25×10^3 , el 25% de los animales presentaron abscesos. Al aumentar el inóculo para obtener la dosis absceso media, se obtuvo una respuesta bimodal de la que se obtuvieron cuando menos dos dosis absceso medias, una con un inóculo de 5×10^3 y la otra con 8.5×10^4 trofozoítos. Simultáneamente, se obtuvieron dos picos de alta agresividad, en los que con un inóculo de 1.25×10^4 , se produjeron abscesos en el 79% y el otro con 2.5×10^5 trofozoítos los cuales indujeron abscesos en el 90% de los animales inoculados. No se determinó si el segundo pico de agresividad de la cepa Hm1:IMSS bajaba al aumentar el inóculo, como en el caso del primer pico pero recientemente; se ha encontrado que la clona A obtenida a partir de la cepa Hm1:IMSS, también altamente virulenta, produce un mayor número de abscesos con 2.5×10^5 que con 5×10^5 células. Sin embargo, no se sabe cuál es la razón de este tipo de comportamiento, puesto que lo lógico sería pensar que la virulencia fuera directamente proporcional al inóculo.

La cepa HK9 de virulencia atenuada, mostró un comportamiento similar al de la cepa Hm1:IMSS, aunque para originar abscesos en los animales se utilizaron inóculos

mayores, lo cual está en correlación con su menor grado de virulencia. También se obtuvieron para esta cepa dos dosis absceso medias, pero con inóculos mucho mayores; una con 3×10^5 y otra con 6.3×10^5 trofozoítos y dos picos de virulencia, uno de baja virulencia con 9×10^4 trofozoítos en el que 12% de los hámsteres presentaron abscesos y otro con inóculos de 5×10^5 trofozoítos por animal; con este inóculo, el 80% de los animales tuvieron abscesos. Los abscesos obtenidos por la cepa HMI:IMSS, fueron grandes o generalizados, en cambio para la cepa HK9, en la mayoría de los casos, los abscesos fueron medianos, pequeños o puntuales.

La clona L-6 avirulenta no produjo abscesos aún cuando se utilizaron inóculos hasta de 9×10^6 trofozoítos; por tanto, no fue posible obtener dosis absceso media con los inóculos probados.

Estos resultados comprueban que la cepa HMI:IMSS es altamente virulenta, la cepa HK9 de virulencia atenuada y la clona L-6 avirulenta.

Al evaluar el efecto de las bacterias E. coli sobre la virulencia "in vivo" de las cepas HMI:IMSS, HK9 y de la clona L-6, se encontró que los trofozoítos de las cepas HMI:IMSS y HK9, preincubados con bacterias inactivadas por tiempos cortos, aumentaron su virulencia en grado

considerable. La virulencia de la cepa HMI:IMSS, se incrementó en forma lineal, a partir de inóculos de 5×10^4 trofozoítos hasta llegar a obtener un 100% de hámsteres con absceso, cuando se usan inóculos de 2×10^5 amibas preincubadas con bacterias. La virulencia de la cepa HK9, también se incrementó cuando los trofozoítos se preincubaron con bacterias, a partir de inóculos de 1×10^4 , hasta llegar también a producir el 100% de hámsteres con abscesos a partir de inóculos de 2×10^5 trofozoítos. La clona L-6, al interaccionar previamente con bacterias, produjo sólo abscesos pequeños en el 25% de los animales, con inóculos tan altos como 9×10^5 trofozoítos.

Por tanto, la cepa HMI:IMSS, virulenta y la cepa HK9 de virulencia atenuada, al inocularse en los animales, mostraron un comportamiento similar, sin bacterias, este comportamiento es bimodal y se obtuvieron dos picos de virulencia y dos dosis absceso medias, pero al inocularse los trofozoítos preincubados con bacterias irradiadas por poco tiempo, se encontró que la virulencia de los trofozoítos, aumentó y presentó un comportamiento lineal con el que se obtuvo el 100% de hámsteres con absceso en ambas cepas, a partir de 2×10^5 trofozoítos por animal.

La fagocitosis es un fenómeno complejo, en el que participan varios eventos; el primero de éstos, es la adhesión a la célula blanco. Por tanto, en esta tesis

se midió la eficiencia de adhesión de los trofozoítos a eritrocitos humanos después de preincubar a los trofozoítos con bacterias, para determinar si había aumento en la eficiencia de adhesión y por tanto, la activación que se observa después de preincubar a los trofozoítos con las bacterias, pudiera ser una consecuencia del aumento de la eficiencia de adhesión. Sin embargo, en estos experimentos no se detectó ningún efecto de las bacterias sobre la adhesión de los trofozoítos de la cepa Hm1:IMSS y HK9, ya que ambas adhirieron el mismo número de eritrocitos humanos cuando se preincubaron con bacterias y cuando se hizo el experimento sin preincubar.

Al determinar el efecto de la preincubación con las bacterias sobre la eritrofagocitosis, de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23, se encontró que la fagocitosis se activó, tanto en los trofozoítos virulentos, como en los de virulencia atenuada, ya que la clona A activó su eritrofagocitosis 66% y la cepa HK9, hasta un 200%. Las clonas L-6 avirulenta y la 23 deficiente en adhesión, fueron las que menor activación presentaron; en particular, la clona 23, la cual sólo se activó 18%, lo que concuerda con el método de aislamiento que se usó para seleccionarla, ya que fue seleccionada por su deficiencia para ingerir bacterias E. coli. Esto sugiere que la adhesión específica de las bacterias a la superficie de la amiba, es importante en la activación de la fagocitosis, aunque las bacterias no

tuvieron efecto sobre la eficiencia de adhesión de los trofozoítos. Los factores responsables de esta activación "in vitro" se desconocen y no se sabe si tienen relación con los que aumentan la virulencia "in vivo" de los trofozoítos. Sin embargo, dada la relación que existe entre la velocidad de fagocitosis de los trofozoítos y la virulencia de las cepas amibianas, es probable que el mecanismo de activación de la virulencia que se dispara al contacto con las bacterias, aumente otras propiedades relacionadas con ésta, como la fagocitosis y efecto citopático.

Se determinó el efecto del mismo tipo de bacterias sobre la capacidad de los trofozoítos de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23, para producir daño sobre monocapas de células epiteliales en cultivo, para lo cual también se incubaron los trofozoítos con las bacterias, antes de los ensayos. Los resultados mostraron que en estas condiciones el efecto citopático de los trofozoítos también aumentó. La capacidad destructiva de la cepa HK9 de virulencia atenuada se elevó considerablemente, pues los trofozoítos de esta cepa sin incubar con bacterias no destruyeron las monocapas y, cuando se preincubaron con las bacterias, la destrucción de la monocapa fue de 45%. La clona A, virulenta, en presencia de bacterias, incrementó su efecto citopático aproximadamente 80%, la clona L-6 avirulenta mostró el 65% de aumento en la destrucción de la monocapa. La clona 23,

también intensificó esta actividad hasta en un 60%. Por tanto, las bacterias E. coli son capaces de activar el daño que producen los trofozoítos de diferentes cepas y clonas con diversas propiedades de virulencia como es la fagocitosis. La activación del efecto citopático en las clonas y cepas, parece no tener relación directa con la activación de la fagocitosis, ya que los trofozoítos se activaron de manera diferente en las diversas propiedades biológicas medidas.

Para ampliar los estudios del efecto de las bacterias sobre la virulencia de los trofozoítos también se determinó el efecto citotóxico de los extractos amibianos de la cepa HK9 y de las clonas A, L-6 y 23, previa interacción con bacterias E. coli CR34. De estos experimentos, se encontró que las bacterias también activaron notablemente la "actividad citotóxica" en todas las cepas y clonas probadas aunque en diferente grado. La cepa HK9 aumentó la capacidad destructiva de sus extractos, hasta en un 300%, la clona A 42.8%, la clona L-6 66% y la clona 23 el 300%.

Estos resultados concuerdan con los ya descritos por Bracha y Mirelman, (1982), respecto a que las bacterias Escherichia coli muestran un efecto activador de la virulencia de los trofozoítos.

Para definir si este efecto activador era específico de las bacterias, se utilizaron eritrocitos humanos en lugar de bacterias, en las incubaciones previas a los ensayos de efecto citopático y citotóxico. Los resultados de estos experimentos, mostraron que los eritrocitos humanos no presentaron activación alguna en el efecto citopático ni en el citotóxico. Esto indica que la activación de la virulencia ambiana es específica de cierto tipo de bacterias y que no cualquier célula, es capaz de activarla. Por otra parte, una explicación probable a los resultados de estos experimentos, es que los trofozoítos que interaccionaron con los eritrocitos, ya se encontraban llenos de éstos y, al ponerse en contacto con la monocapa celular ya no eran capaces de fagocitar células epiteliales. En el caso del efecto de los extractos amibianos sobre la monocapa, es probable que, durante la incubación de los trofozoítos con los eritrocitos, éstos disminuyeran sus niveles de enzimas y proteasas y saturaran los receptores de la amiba, por lo que los extractos ya no produjeron destrucción alguna.

En conclusión, en esta tesis se demuestra que la interacción previa de los trofozoítos con bacterias vivas E. coli de la cepa CR34, activan la capacidad eritrofágica, el efecto citopático y la "actividad citotóxica" de los extractos amibianos probados. Esta activación se presentó, tanto en los trofozoítos de cepas virulentas, como en las

cepas avirulentas y de virulencia atenuada a tiempos cortos de interacción.

Además, se encontró que la adhesión no se incrementó cuando se preincubaron los trofozoítos con las bacterias, lo que indica que la adhesión, por sí misma, no es la responsable del aumento de la virulencia, sino que ésta es activada por algún otro mecanismo.

Por otro lado, se mostró que la presencia de bacterias inactivadas por irradiación E. coli cepa 055, también estimulan la agresividad de E. histolytica, ya que en los experimentos de virulencia "in vivo", se observó que la agresividad de los trofozoítos con diferente fenotipo de virulencia, también aumenta grandemente, como se demostró con la cepa HMI:IMSS y HK9. También se observó que la virulencia de los trofozoítos medida en hámsteres jóvenes, es directamente dependiente del inóculo sólo en presencia de bacterias y, cuando éstos no interaccionan con los trofozoítos, el comportamiento agresivo de las amibas no muestra una dependencia lineal del inóculo, sino que es bimodal. Se obtuvieron dos picos de agresividad y dos dosis absceso medias para ambas cepas, aunque para la cepa HK9 se requirieron inóculos mayores.

Estos resultados, nos sugieren que la fagocitosis de bacterias E. coli de la cepa CR34 o 055 producen un aumento en la agresividad de los trofozoítos de E. histolytica, tanto en trofozoítos virulentos como de virulencia atenuada.

CONCLUSIONES.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- 1) Existe heterogeneidad en los trofozoítos de la cepa HMI:IMSS en cuanto a su eficiencia de adhesión a eritrocitos humanos, ya que fue posible aislar subpoblaciones amibianas deficientes en adhesión.
- 2) El método de los gradientes de ficoll utilizado para el aislamiento de trofozoítos deficientes en adhesión, resulto adecuado, ya que se logró obtener una subpoblación de trofozoítos, deficiente en adhesión a eritrocitos en más del 50%, en comparación con la cepa silvestre.
- 3) La adhesión específica de los trofozoítos a eritrocitos humanos es un evento necesario para que los trofozoítos lleven a cabo eficientemente los procesos de eritrofagocitosis y de destrucción de los epitelios en cultivo, puesto que los trofozoítos deficientes en adhesión resultaron ser también deficientes en fagocitosis y en su capacidad para destruir monocapas celulares en cultivo de la línea MDCK; por lo que se aportan nuevas evidencias para afirmar que la adhesión específica de los trofozoítos a la célula blanco, es un prerequisite en el mecanismo de agresión de E. histolytica.

- 4) La actividad de lectina también se encontró disminuída en las clonas deficientes en adhesión, lo cual correlaciona con la eficiencia de adhesión.
- 5) Se obtuvieron dos dosis abscesos medias para la cepa HMI:IMSS virulenta y la cepa HK9 de virulencia atenuada.
- 6) Simultáneamente, se obtuvieron dos picos de agresividad para ambas cepas, aunque para la cepa HK9 se requirieron inóculos mayores.
- 7) Las bacterias mostraron un efecto activador de la virulencia de E. histolytica "in vivo" y sobre su eritrofagocitosis, efecto citopático y actividad citotóxica.
- 8) Las bacterias no incrementaron la adhesión, lo que indica que ésta, por sí misma, no es la responsable del aumento de la virulencia.
- 9) La activación por bacterias, se presentó tanto en trofozoítos virulentos como de virulencia atenuada.
- 10) La activación del efecto citopático y citotóxico es específica de cierto tipo de bacterias, puesto que los eritrocitos humanos no activaron estas propiedades.

BIBLIOGRAFIA.

Artigas, J.; Otto, I. y Kawada, M. E. (1966). Acción de Entamoeba histolytica sobre leucocitos polimorfonucleares humanos vivos. Bol. Chileno Parasitol. 21: 114.

Aust-Kettis, A. and Sundqvist, K. G. (1978). Dynamics of the interaction between Entamoeba histolytica and components of the immune response. I. Capping and endocytosis: influence of inhibiting and accelerating factors; variation of the expression of surface antigens. Scand. J. Immunol. 7: 35.

Blagi, F. (1973). Amibiasis En: Enfermedades parasitarias. La Prensa Médica Mexicana (editores). México, pp. 81.

Bos, H. J. (1979). Entamoeba histolytica: Cytopathogenicity of intact amoebae and cell-free extracts; isolation and characterization of an intracellular toxin. Exp. Parasitol. 47: 369.

Bos, H. J. and Hage, A. J. (1975). Virulence of bacteria-associated, crithidia-associated, and axenic Entamoeba histolytica: Experimental hamster liver infections with strains from patients and carriers. Zeitschrift für Parasitenkunde. 47: 79.

Bos, H. J. and Van der Eijk, A. (1980). Serum-inhibited toxicity of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11 (Supl. 1): 135.

- Bracha, R.; Kobilier, D. and Mirelman, D. (1982). Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of Entamoeba histolytica. Infect. Immun. 36: 369.
- Bracha, R. and Mirelman, D. (1983). Adherence and ingestion of Escherichia coli serotipo 055 by trophozoites of Entamoeba histolytica. Infect. Immun. 40: 882.
- Bracha, R. and Mirelman, D. (1984). Virulence of Entamoeba histolytica trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. J. Exp. Med. 160: 353.
- Brandt, H. y Pérez-Tamayo, R. (1956). Amibiasis cutánea. Prensa Médica Mexicana (editores) México. 21:1.
- Brandt, H. y Pérez-Tamayo, R. (1970). Amibiasis. La Prensa Médica Mexicana. México. pp. 892.
- Brumpt, E. (1949). Precis de Parasitology. Masson, París. Edit. pp. 183-224.
- Calderón, J. and Tovar-Gallegos, G. R. (1980). Resistance to immune lysis induced by antibodies in Entamoeba histolytica. En: The Host-Invader Interplay. Van den Bossche. (Ed.) pp. 227-230.
- Calderón, J.; Muñoz, M. L. and Acosta, H. M. (1980). Surface redistribution and release of antibody-induced caps in Entamoeba. J. Exp. Med. 151: 184.

Cervantes, M. A. (1980). Estudio de los procesos de división celular y nuclear en Entamoeba. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias. Depto. Biol. Cel. CINVESTAV, IPN. México.

Chadee, K. and Meerovitch, E. (1984). The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the gerbil (Meriones unguiculatus). Am. J. Pathol. 117:71.

Chadee, K. and Meerovitch, E. (1985). Entamoeba histolytica: early progressive pathology in the cecum of the gerbil (Meriones unguiculatus). Am. J. Trop. Med. Hyg. 34:283.

Chávez, B.; Martínez-Palomo, A. y De la Torre, M. (1978). Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de Entamoeba invadens, E. histolytica y E. coli. Arch. Inv. Med. (Méx.) 9 (Supl. 1): 113.

Cheng, C. T. (1978). Parasitología General. Editorial A.C. Madrid. pp. 209-225.

Chevez, A.; Iturbide, I.; Aubanel, M. y Segura, M. (1971). Actividad fibrinogénica y fibrinolítica de E. histolytica sobre el plasma humano "in vitro". Arch. Inv. Med. (Méx.) 2 (1): 211.

Chevez, A.; Iturbide-Alesio, F.; Segura, M. y Corona, D. (1972). Fagocitosis de eritrocitos humanos por Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Méx.) 3 (Supl. 2): 275.

Chevez, A.; Sepúlveda, B.; Segura, M. y Ortíz, Ortíz, M. (1974). Aspectos morfodinámicos de la agonía y muerte de los trofozoítos de E. histolytica, sometidos a la acción del suero inmune. Arch. Inv. Med. (Méx.) 5, Supl. 2: 347.

Chevez, A.; Iturbide-Alessio, I.; Segura, M. y Corona, D. (1975). Fagocitosis de eritrocitos humanos por E. histolytica. Arch. Inv. Med. (Méx.) 3. Supl. 2: 275.

Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoólogos, (1982). Nueva clasificación de los protozoarios. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Protozoología. U.N.A.M. pp. 38.

Das, V.N.; Padma, M. C.; Isho, M. and Habibullah, C. M. (1979). Amoebiasis and prostaglandins. Prostaglandins and Medicine. 2: 317.

Deas, J. E. and Miller, J. J. (1977). Plasmalemmal modification of Entamoeba histolytica "in vivo". J. Parasitol. 63: 25.

Diamanstein, T. J.; Klos, M.; Gold, D. and Hahn, H. (1981). Interaction between Entamoeba histolytica and immune system I. Mitogenicity of Entamoeba histolytica extracts for human peripheral T. lymphocytes. J. Immunol. 126: 2084.

De la Torre, M.; De la Hoz, R.; Landa, L. y Sepúlveda, B. (1971). Cultivos axénicos de Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 2, Supl. 1: 165.

Diamond, L.S. (1968). Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Shaudinn 1903 and E. histolytica-like amoebae. J. Parasitol. 54:1047.

Diamond, L.S.; Phillips, B.P. and Bartgis, I.L. (1974). A comparison of the virulence of nine strains of axenically cultivated E. histolytica in hamster liver. Arch. Inv. Med. (M ex.) 5, Supl. 2: 423.

Diamond, L.S.; Harlow, D. R. and Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 431.

Dobell C. (1919). The amoeba living in man. A zoological monograph. J.Bale, sons Danielsson (Eds.) Londres.

Eagle, H. (1959). Aminoacid metabolism in mammalian cell cultures. Science. 130: 432.

Eaton, R. D.; Meerovitch, E. and Costerton, J. W. (1969). A surface active lysosome in Entamoeba histolytica. Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg. 63: 678.

Eaton, R. D.; Meerovitch, E. and Costerton, J.W. (1970). The functional morfology of pathogenicity of Entamoeba histolytica. Ann. Trop. Med. Parasitol. 64: 229.

- Faust, C. E.; Beaver, C. P. and Jung, C. R. (1975). Animal agents and vectors of human disease. Fourth edition. Lea and Febiger. Philadelphia. pp. 63-66.
- García-Sainz, M.; Silva-Arteaga, R. y De la Huerta, R. (1971). Amibiasis de órganos genitales en ambos sexos. Arch.Inv.Med. (Méx.) 1: 367.
- Garvey, J. S.; Cremer, N. E. and Sussdorf, D. H. (1977). Reagents. Cap. IV En: Methods in immunology. Benjamin (Ed) Inc. Reading. Massachusetts 3rd edition.
- Gharidian, E. and Meerovitch, E. (1979). Pathogenicity of axenically cultivated Entamoeba histolytica, strain 200:NIH, in the hamster. J. Parasitol. 65: 768.
- Gillin, F. R. and Diamond, L. S. (1978). Clonal growth of Entamoeba histolytica and other species of Entamoeba in agar. J. Protozool. 25: 539.
- Gitler, C.; Calef, E. and Rosenberg, I. (1984). Cytopathogenicity of Entamoeba histolytica. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 307: 73.
- Griffin, J. L. and Juniper, K. (1972). Ultrastructure of Entamoeba histolytica from human amoebic dysentery. Arch. Pathol. 21: 271.

Jarumilinta, R. and Kradolfer, F. (1964). The toxic effect of Entamoeba histolytica on leucocytes. Ann. Trop. Med. Parasitol. 58: 375.

Jones, G. (1977). The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells. En: Receptors and recognition Microbial Interactions. J. L. Reissing (Ed.). Chapman and Hall. Londres p. 139.

Knigth, R. (1977). An "in vitro" model for measuring the cytophatic effect of Entamoeba histolytica. J. Parasitol. 63: 388.

Knigth, R.; Bird, R. G. and Mc Caul, T. F. (1975). Fine Structural changes of Entamoeba histolytica-rabitt kidney cell (RK 13) interface. Ann. Trop. Med. Parasitol. 69, Supl. 2: 179.

Kobiler, D. and Mirelman, D. (1980). Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. Infect. Immun. 29: 221.

Kobiler, D. and Mirelman, D. (1981). Adhesion of Entamoeba histolytica trophozoites to monolayers of human cells. J. Infect. Dis. 144: 539.

Lee, E.; Palacios, O. y Landa, L. (1971). Estudio de la actividad enzimática de E. histolytica procedente de cultivos axénicos. Arch. Inv. Med. (Méx.). 2 Supl. 1: 173.

Ludvik, J. and Shipstone, A. C. (1970). The ultrastructure of Entamoeba histolytica. Bull. W.H.O. 43: 301.

Lushbaugh, W. B.; Kairalla, A. B. and Pittman, F. E. (1976). Phagocytosis in Entamoeba histolytica. J. Protozool. 23: 12.

Lushbaugh, W. B.; Kairalla, A. B.; Cantey, J. R.; Hofbauer, A. F.; Pittman, J. C. and Pittman, F. E. (1978a). Cytotoxicity of a cell-free extract of Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Méx.) 9 (Supl. 1): 233.

Lushbaugh, W. B.; Kairalla, A. B.; Loadholi, C. B. and Pittman, F. E. (1978b). Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated Entamoeba histolytica. The Am. J. Trop. Med. Hyg. 27:248.

Lushbaugh, W. B.; Kairalla, A. B.; Cantey, R. F.; Hofbauer, F. and Pittman, F. E. (1979). Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from Entamoeba histolytica. J. Infec. Dis. 39: 9.

Maniatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. USA. pp. 545.

Martínez-Palomo, A. (1982). The biology of Entamoeba histolytica. Research Studies Press. Great Britain. pp. 161.

Martínez-Palomo, A.; Orozco, E. and González-Robles, A. (1980). Entamoeba histolytica: Topochemistry and Dynamics of the cell Surface. En. The Host-Invader Interplay. H. Van den Bossche (ed.) Elsevier North Holland. pp. 55-68.

Martínez-Palomo, A.; Gonzalez-Robles, A.; Chávez, B.; Orozco, E. and Fernández-Castelo, S. (1985). Structural basis of cytolytic mechanism of Entamoeba histolytica. J. Protozool. 32: 165.

Mattern, C. F. T. and Keister, D. B. (1977). Experimental amebiasis II. Hepatic amebiasis in the newborn hamster. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 402-411.

Mattern, C. F. T.; Keister, D. B. and Caspar, P. A. (1978). Experimental amebiasis III. A rapid "in vitro" assay for virulence of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27: 882.

Mattern, C. F. T.; Keister, D. B. and Natovitz, P. C. (1980). Entamoeba histolytica "toxin" fetuin neutralizable and lectin-like. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39: 26.

Meerovitch, E. and Gharidian, E. (1978). Restoration of virulence of axenically cultivated Entamoeba histolytica by cholesterol. Canadian J. Microbiol. 24: 63.

- Mora-Galindo, J.; Martínez-Palomo, A. y Chávez, B. (1978). Interacción entre Entamoeba histolytica y el epitelio cecal de cobayo. Arch. Inv. Med. (Méx.) 9 Supl. 1: 261.
- Muñoz, M. L.; Calderón, J. and Rojkind, M. (1980). Collagenase of Entamoeba histolytica: The role in tissue invasion. Gastroenterology. 79: 1041.
- Muñoz, M. L.; Calderón, J. and Rojkind, M. (1982). The collagenase of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 155: 42.
- Muñoz, M. L.; Rojkind, M. y Calderón, J.; Tanimoto, M.; Arias, N. S. and Martínez-Palomo, A. (1984). Entamoeba histolytica: Collagenolytic activity and virulence. J. Protozool. 31: 468.
- Noble, E. R. y Noble, G. A. (1976). The biology of animal parasites. Lea and Febiger (Ed.). Filadelfia. p. 60.
- Novikoff, A. B.; Novikoff, P. M.; Davis, C. and Quintana, N. (1972). Studies on microperoxisomas. II. A cytochemical method for light and electron microscopy. J. Histochem. Cytochem. 20: 1006.
- Olguín, T. (1984). Estudio comparativo de la fagocitosis en dos clones de Entamoeba histolytica de diferente virulencia. Tesis Profesional. ENEP-Iztacala, UNAM. México.

Orozco, E. (1978). Efecto citopático de Entamoeba histolytica sobre células en cultivo. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

Orozco, E.; Martínez-Palomo, A. y López-Revilla, R. (1978). Un modelo "in vitro" para el estudio cuantitativo de la virulencia de E. histolytica. Arch. Inv. Med. (Méx.) 9: 257.

Orozco, E.; Martínez-Palomo, A. y Guarneros, G. (1980). Virulencia y propiedades de superficie de varias cepas axénicas de Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Méx.). 11: 153.

Orozco, E. (1981). Virulencia y propiedades de superficie de Entamoeba histolytica. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

Orozco, E.; Guarneros, G. y Martínez-Palomo, A. (1982a). Clonas de E. histolytica deficientes en fagocitosis presentan deficiencia en virulencia. Arch. Inv. Med. (Méx.) 13 (Supl. 3): 137.

Orozco, E; Martínez-Palomo, A; González-Robles, A; Guarneros, G. y Mora-Galindo, J. (1982b). Las interacciones lectina-receptor median la adhesión de E. histolytica a células

epiteliales. Relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. Arch. Inv. Med. (Méx.) 13 (Supl. 3): 159.

Orozco, E.; Fernández-Castelo, S. y Martínez-Palomo, A. (1982c). Detección del daño celular temprano producido por Entamoeba histolytica sobre epitelios. Arch. Inves. Med. 13, (Supl. 3): 169.

Orozco, E.; Guarneros, G.; Martínez-Palomo, A. and Sánchez, T. (1983). Entamoeba histolytica phagocytosis as virulence factor. J. Exp. Med. 158: 1511.

Orozco, E.; Suárez, M. E. y Sánchez, T. (1985). Different adhesion, phagocytosis and virulence in clones from Entamoeba histolytica, strain HM1:IMSS. I. J. Parasitol. 15: 655.

Orozco, E.; Arroyo, R.; Rodríguez, M. A. and García-Rivera, G. (1986). Identification of an Entamoeba histolytica adhesin using adhesion-deficient mutants and monoclonal antibodies. Molecular Strategies of Parasitic Invasion. UCLA. Symposia on Molecular and Cellular Biology. Alan, R. Liss A. Inc. New York. En prensa.

Phillips, B. P.; Wolfe, P. A.; Ress, C. W.; Gordon, H. A.; Wright, W. H. and Reiniers, J. A. (1955). Studies on the amoeba-bacteria relationship in amebiasis. Comparative results of the intracecal inoculation of germfree, monocontaminated and conventional guinea pigs with E. histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 4: 675.

Phillips, B. P.; Diamond, L. S.; Bartgis, I. L. and Stuppler, S. A. (1972). Results of intracecal inoculation of germfree and conventional guinea pigs and germfree rats with axenically cultivated Entamoeba histolytica. J. Protozool. 19: 498.

Ravdin, J. I. and Guerrant, R. L. (1980). Studies on the cytopathogenicity of Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Méc.) 11, (Supl. 1): 123.

Ravdin, J. I. and Guerrant, R. L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J. Clin. Invest. 68: 1305.

Ravdin, J. I.; Murphy, C. F.; Salata, R.,A.; Guerrant, R. L. and Hewlett, E. L. (1985). The N-Acetyl-D-Galactosamine inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 151: 804.

Reed, S. L.; Sargeant, P. G. and Braude, A. I. (1983). Resistance to lysis by human serum of pathogenic Entamoeba histolytica. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77: 248.

Riadura, S. C. y López, D. C. (1968). Análisis de la mortalidad en el Hospital General de México. SSA. Rev. Med. Hosp. Gral. Méc. 31: 259.

Rodríguez, M.A. (1985). Mutantes en propiedades de superficie: una herramienta para el estudio de la virulencia de Entamoeba histolytica. Tesis Profesional. ENEP-Iztacala, UNAM. México.

Rodríguez, M. A. and Orozco, E. (1986). Isolation and characterization of phagocytosis and virulence-deficient mutants of Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 154: 27.

Said-Fernández, S. and López-Revilla, R. (1983). Latency and heterogenicity of Entamoeba histolytica hemolysins. Z. Parasitenkunde. 69: 435.

Salata, R. A. and Ravdin, J. I. (1985). The N-Acetyl-D-Galactosamine inhibitable lectin of Entamoeba histolytica II. Mitogenic activity for human lymphocytes. J. Infect. 151: 816.

Smith, H. (1977). Microbial surfaces in relation to pathogenicity. Bacteriol. Rev. 41: 475.

Smith, J. W.; McQuay, R. M.; Ash, L. R.; Melvin, D. M.; Orihel, T. C. and Thompson, J. H. (1979). Diagnostic medical parasitology intestinal protozoa. American Society of Clinical Pathologist, Education Products Division. USA.

Suárez, M. E. (1985). La fagocitosis como factor de virulencia en Entamoeba histolytica. Tesis Profesional. ENEP-Iztacala, UNAM. México.

Takeuchi, A. and Phillips, P. B. (1975). Electron microscopic studies of experimental Entamoeba histolytica infection in the guinea pig. I. Penetration of the intestinal epithelium by trophozoites. Ann. J. Trop. Med. Hyg. 24: 34.

Trissl, D.; Martínez-Palomo, A.; Argüello, C.; De la Torre, M. and De la Hoz, R. (1977). Surface properties related to concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several Entamoeba strains J. Exp. Med. 145: 652.

Trissl, D.; Martínez-Palomo, A.; De la Torre, M.; De la Hoz, R. and Pérez de Suárez, E. (1978). Surface properties of Entamoeba: Increased rates of human red cell phagocytosis in pathogenic strains. J. Exp. Med. 148: 1137.

Tsutsumi, V.; Mena-López, R.; Anaya-Velázquez, F. and Martínez-Palomo, A. (1984). Cellular basis of experimental amebic liver abscess formation. Am. J. Pathol. 117: 81.

Weinbach, E. C.; Clagget, C. E.; Takeuchi, T. and Diamond, L. S. (1978). Biological oxidation and flavoproteins catalysis in Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Méx.). 9 (Supl. 1): 89.

Westphal, A. (1937). Betrachtungen und experimentelle Untersuchungen zur Virulenz der Entamoeba histolytica. beim Menschen. Arch. F. Schiffs. u. Tropen. Hyg. 41: 162.

W. H. O. (1969). Expert Committee. Amoebiasis. Technical Report Series No. 421 p. 7.

Wittner, M. and Rosebaum, R. M. (1970). Role of bacteria in modifying virulence of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 755.

Wu, T. P.; Wu, C. Y.; Chen, C. M.; Lu, H. M.; Meng, K. Y.; Chu, S. P. and Jung Sun, C. (1968). Medical and surgical treatment in a case of amoebiasis of the left lung. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 73.

Young, J. D. F.; Young, T. M.; Lu, L. P.; Unkeless, J. G. and Cohn, Z. A. (1982). Characterization of membrane pore-forming protein from Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 156: 1677.

APENDICE

Penicilina G sódica cristalina.

Penicilina (Lakeside)	1 X 10 ⁶ U
Agua bidestilada	20.0 ml

Estreptomicina S.

Estreptomicina (Lakeside)	1.0 g
Agua bidestilada	14.0 ml

Suero bovino completo.

Estreptomicina	0.5 ml
Mezcla de vitaminas (Diamond)	20.0 ml
Penicilina	0.5 ml
Suero bovino descomplementado (Biofluids)	100.0 ml

Medio TYI-S-33 (Diamond y col. 1978).

Acido ascórbico	0.2 g
Biosate (digerido pancreático)	30.0 g
Cisteína	1.0 g
Citrato férrico	23.6 mg
Cloruro de sodio	2.0 g
Dextrosa	10.0 g
Fosfato de potasio dibásico	1.0 g

Fosfato de potasio monobásico	0.6 g
Agua desionizada	840.0 ml
pH 6.8	

Medio TYI-S-33 completo.

Suero bovino completo	2.0 ml
Medio TYI-S-33	10.0 ml

Glutaraldehído 2.5 %.

Glutaraldehído 25 %	10.0 ml
Solución amortiguadora de fosfatos	90.0 ml

Solución salina 0.85 %.

Cloruro de sodio	8.5 g
Agua bidestilada	1000.0 ml

Solución Alsever (Garvey y col., 1977).

Acido cítrico	0.55 g
Citrato de sodio	8.0 g
Cloruro de sodio	4.2 g
Dextrosa	20.5 g
Agua bidestilada	1000.0 ml
pH 6.1	

Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS).

Cloruro de potasio	0.2 g
Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato de potasio monobásico	0.2 g
Fosfato de sodio dibásico	1.15 g
Agua bidestilada	1000.0 ml
pH 7.0	

Medio Eagle Modificado por Dulbecco (Eagle, 1959).

Medio Eagle modificado por Dulbecco

(Gibco)	20.0 g
Bicarbonato de sodio	2.2 g
Agua bidestilada	1000.0 ml

Medio Eagle Modificado por Dulbecco completo.

Estreptomicina	13.0 mg
Penicilina	1000.0 U
Suero de ternera descomplementado	10.0 ml
Medio Eagle Modificado por Dulbecco	100.0 ml

Medio de Luria (Maniatis y col., 1982).

Bacto triptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio	10.0 g

Agua bidestilada	1000.0 ml
------------------	-----------

pH 7.5

Medio de conservación de cepas bacterianas

(Maniatis y col., 1982).

Bacto agar (Difco)	0.75 g
Caldo nutritivo (Difco)	0.90 g
Cloruro de sodio	0.50 g
Agua bidestilada	1000.0 ml

Solución amortiguadora 2 amino, 2 metil propanodiol.

2 amino, 2 metil propanodiol (1,3)	5.25 g
------------------------------------	--------

Agua bidestilada	1000.0 ml
------------------	-----------

pH 9.7

Solución para Tinción de Novikoff (Novikoff y col., 1972).

3,3' diaminobencidina (Sigma)	0.02 g
-------------------------------	--------

Peróxido de hidrógeno 30 %	0.07 ml
----------------------------	---------

Solución amortiguadora 2 amino,

2 metil propanodiol	10.0 ml
---------------------	---------

Solución salina amortiguadora de fosfatos 50 mM.

Cloruro de potasio	0.2 g
--------------------	-------

Cloruro de sodio	8.0 g
------------------	-------

Fosfato de potasio monobásico	6.8	g
Fosfato de sodio dibásico	7.0	g
Agua bidestilada	1000.0	ml
pH 5.7		

Solución amortiguadora de hemaglutinación.

Beta-mercaptoetanol 1 mM	5.0	μl
Fluoruro de fenil metil sulfonil 5 mM	1.0	μl
Solución salina amortiguadora de fosfatos 50 mM	1.0	ml
pH 8.7		

Solución amortiguadora de boratos.

Acido bórico 0.2 M	80.0	ml
Tetraborato de sodio 0.05 M	120.0	ml
pH 8.7		

Solución de azul de metileno.

Azul de metileno	1.0	g
Solución amortiguadora de boratos	100.0	ml