



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

I Z T A C A L A

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD COLAGENOLITICA DE
Entamoeba histolytica EN CULTIVO POLIXENICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

MARCO ANTONIO MAGOS CASTRO



MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fué realizado, bajo la asesoría de la Doctora María de Lourdes Muñoz Moreno, en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional. El desarrollo de esta tesis fué apoyado, mediante una beca otorgada por el CONACYT (No. de registro 58971) y el donativo (P219CCOL880157).

DEDICATORIAS:

A MIS PADRES: SILVESTRE Y CELIA

A ALEJANDRO

A TODOS MIS HERMANOS

AGRADECIMIENTOS:

A la Doctora María de Lourdes Muñoz Moreno, por haberme brindado todo el apoyo durante mi estancia en su laboratorio. Así mismo le agradezco las molestias que se tomó al aceptar la asesoría de esta tesis.

A la Q. F. Margarita De La torre por proporcionarme el material biológico empleado en este trabajo. Por otra parte, le agradezco los consejos académicos y personales que me ofreció.

A la Q. F. B. Rosalinda Tovar Gallegos por su disponibilidad en todo momento, que tuvo para mí y siempre en la medida de las posibilidades me aclaró las dudas. También le agradezco la realización del material fotográfico, que aparece en esta tesis.

Al Biol. Javier Pérez García y al P. de Biol. Miguel Angel Moreno Galeana. quienes a lo largo de la carrera me han apoyado incondicionalmente. Les agradezco el haberme orientado cuando ingresé al laboratorio.

Al P. de Biol. Alois Zagal P. por los momentos agradables que compartimos.

A la Biol. Gloria León. por que siempre se mostró interesada en mi trabajo y realizó algunas sugerencias.

A la P. de Biol. Eloísa I. Murueta G. por brindarme su amistad.

A la P. de Biol. Verónica I. Hernández R. por ofrecerme su compañía y por ser una persona muy importante en mi vida, ya que su apoyo y comprensión han sido determinantes.

INDICE

ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
A.- RESUMEN.....	1
B.- INTRODUCCION.....	3
I) Epidemiología.....	3
II) Clasificación.....	5
III) Biología de <u>Entamoeba histolytica</u>	5
IV) Ciclo Biológico.....	6
V) Cultivo.....	7
VI) Diagnostico.....	8
VII) Antecedentes.....	10
C.- OBJETIVOS.....	13
D.- MATERIAL.....	14
I) Cultivo axénico.....	15
II) Cultivo polixénico.....	15
III) Extracción de colágena.....	17
IV) Electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).....	18
V) Determinación de la concentración de la colágena tipo I.....	21
VI) Ensayo de la actividad colagenolítica.....	21
VII) Separación mediante Percoll.....	24
VIII) Reactivos.....	25

E.- METODOS.....	27
1.- Cepa axénica de <u>E. histolytica</u> HM-1.....	27
2.- Cepas polixénicas de <u>E. histolytica</u>	28
3.- Extracción de colágena.....	29
4.- Electroforesis en geles de poliacrilamida de la colágena tipo I.....	30
5.- Determinación de proteína.....	31
6.- Ensayo de la actividad colagenolítica.....	33
7.- Curva estandar de colágena tipo I.....	35
8.- Separación de las células mediante Percoll.....	35
F.- RESULTADOS.....	38
1.- Actividad colagenolítica en trofozoítos de <u>E. histolytica</u> cepa axénica HM-1.....	38
2.- Actividad colagenolítica en trofozoítos de <u>E. histolytica</u> de cultivos polixénicos.....	38
3.- Heterogeneidad de las cepas polixénicas.....	47
G.- DISCUSION.....	51
H.- CONCLUSIONES.....	53
I.- BIBLIOGRAFIA.....	54

ABREVIATURAS

TYI-S-33	Medio para amibas (tripticasa, extracto de levadura hierro y suero)
PVA	Alcohol polivinilico
CEPA HM-1	Cepa de origen humano de México
TRIS	(Hidroximetil) aminometano
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N,N'- Tetrametiletilenodiamina
PBS-A	Amortiguador de fosfatos salinos adecuado para amibas
PERCOLL (PVP)	Particulas de silice coloidal recubiertas con polivinil pirrolidon
rpm	revoluciones por minuto
Kd	Kilodaltones
BSA	Albumina de suero de bovino

LISTA DE FIGURAS

- 1.- Electroforesis de la colágena tipo I.
- 2.- Curva estandar para determinar concentraciones de proteína de colágena tipo I, por el método de rojo de sirio.
- 3.- Ensayo de la colagenasa con rojo de sirio.
- 4.- Actividad colagenolítica de HM-1.
- 5.- Actividad colagenolítica de cepas polixénicas.
- 6.- Actividad colagenolítica de cepas polixénicas.
- 7.- Microscopía de luz, de la digestión de películas de colágena tipo I.
- 8.- Gel de colágena tipo I.
- 9.- Gradientes de Percoll de las cepas polixénicas de Entamoeba histolytica.
- 10.- Actividad colagenolítica de los anillos de cada cepa.
- 11.- Digestión del gel de colágena por el anillo 4 del gradiente de percoll.

A.- RESUMEN

Se ha demostrado la presencia de la actividad de colagenasa específica por colágena tipo I en trofozoítos de cultivo axénico de Entamoeba histolytica. Así mismo, en nuestro laboratorio, se ha detectado la actividad de colagenasa en los gránulos secretados por la amiba. Esta enzima se ha correlacionado con la virulencia de las amibas, aunque no se ha estudiado su naturaleza en trofozoítos de cultivos polixénicos, aislados de pacientes asintomáticos y sintomáticos. Por lo tanto, el objetivo general de nuestro trabajo fué la evaluación de la actividad de colagenasa de las cepas de cultivo polixénico de E. histolytica. Para poder realizar estos estudios se procedió a separar las amibas de las bacterias y material particulado, propio del cultivo, mediante filtración, centrifugación diferencial y un gradiente de percoll. En todos los casos se encontró que los 6 anillos y el sedimento contenían trofozoítos. La cepa HM-48 de un paciente sintomático con absceso hepático y colitis amibiana presentó actividad de colagenasa. Dentro de los trofozoítos provenientes de portadores asintomáticos (HM-43, HM-44 y HM-46) esta actividad enzimática fué muy variable. Esto nos sugirió que teníamos poblaciones heterogéneas en nuestros cultivos. Para observar estas diferencias se estudiaron los trofozoítos separados por Percoll. Estos presentaron diferentes actividades de

colagenasa, así mismo, se detectaron amibas provenientes de estos anillos sin actividad de colagenasa.

Estos resultados sugieren que, Los trofozoitos de Entamoeba histolytica de pacientes asintomáticos en cultivo polixénico contienen cepas de amibas virulentas y no virulentas.

B.- INTRODUCCION

La amibiasis es una infección causada por el parásito Entamoeba histolytica con o sin manifestación clínica y constituye un grave problema de salud en muchos países; alrededor del 10 % de la población mundial alberga a este protozooario (1). El 15 % de estos casos son sintomáticos, el tipo de lesión principal se produce en la mucosa intestinal y en los casos más graves, existen lesiones en el hígado u otros órganos (2). La mayoría de las infecciones (80% al 99 %) son completamente asintomáticas y las amibas se encuentran como comensal en el colon (1,3).

I.- EPIDEMIOLOGIA

La historia de este microorganismo se remonta a 1869 cuando Timothy Richard Lewis, describe a las amibas en heces humanas, en 1875 Lösch, realiza la primera descripción de disentería amibiana y produce colitis en perros inoculando con heces de pacientes, por vía oral o rectal. El primer caso de amibiasis en el hemisferio occidente es reportado por Osler en 1890. En 1891 Lafleur y Councilman, describen la patología de la colitis amibiana. En 1893 es descrito el quiste de Entamoeba histolytica y de Entamoeba coli por Quincke y Ross. En 1903 Fritz Schaudinn lo denomina como Entamoeba histolytica debido a su capacidad aparente para

destruir tejidos y distingue dos tipos de amibas que infectan al hombre; E. coli que es el comensal y E. histolytica asociada casi siempre con la invasión y la enfermedad (4).

En 1925 William Boeck y Drobhlav, utilizando el medio "Locke-albumina-huevo" cultivaron sucesivamente a E. histolytica (referido en 4). En 1928 Dobell en estudios realizados con monos, induce enquistamiento de trofozoítos amibianos agregando almidón de arroz al medio de Boeck-Drobhlav (referido en 4), y describe el ciclo de vida completo de este parásito.

Esta serie de trabajos, establecieron las bases para investigaciones posteriores, que continuaron en la década de los años 50's. Se estableció que la amibiasis es una enfermedad entérica que se adquiere por ruta fecal-oral usualmente de persona a persona (4).

Grandes avances en la investigación sobre la amibiasis incluyen el desarrollo del medio TYI-S-33 para el crecimiento de amibas en condiciones axénicas por Diamond 1968-1978 (5). Con el cultivo axénico de este parásito se incrementaron los estudios de amibas en animales experimentales y en sistemas de cultivo de tejidos. Así mismo se han realizado análisis bioquímicos, de enzimas amibianas, posibles toxinas y adhesión de proteínas que han permitido en parte comprender y controlar esta enfermedad invasora (3,4).

II.- CLASIFICACION

Entamoeba histolytica pertenece al phylum protozoo, subphylum Sarcodina, superclase Rhizopoda, clase Lobosea. orden Amoebida, familia Entamoebidae (2,6), genero Entamoeba que incluye las especies: E. histolytica, E. coli, E. polecki, E. gingivalis, E. moshkovskii e E. invadens (2,3).

III.- BIOLOGIA DE Entamoeba histolytica

Los trofozoitos son células vegetativas que se reproducen por fisión binaria, no tienen una forma fija y se mueven unidireccionalmente a través de un pseudópodo llamado lobopodia (ectoplasma). Miden de 15-50 μm de diámetro (2,7), aunque esto es dependiente de la cepa y el estado de desarrollo, son además anaerobios facultativos que crecen a pH de 6.0 - 6.5. Contienen un núcleo sencillo que mide de 4-5 μm con cromatina periférica, el citoplasma consiste de un ectoplasma claro y un endoplasma granular que contiene numerosas vacuolas lisosomales y fagocíticas. Presenta estructuras similares a microfilamentos de actina, al parecer carece de citocromos, ruta metabólica de Embden-Meyerhof y reticulo endoplásmico rugoso. Tiene un sistema de malato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa con una capacidad límite para consumir oxígeno un poco arriba del 5 % (2,3,4,8).

Los quistes representan la forma infectante, son de forma oval o redonda, no tienen movimiento y presentan una pared celular de quitina de 0.5 μm de grosor que es muy resistente a condiciones ambientales extremas como por ejemplo: no se desecan a temperaturas arriba de 50°C, soportan periodos largos en agua clorada, resisten secreciones gástricas.

El quiste mide de 10-20 μm presenta de uno a cuatro núcleos dependiendo del estado de maduración, estos núcleos son morfológicamente iguales al núcleo de los trofozoítos (2, referido en 4). Contienen cuerpos cromatoides con bordes lisos y redondos, estos cuerpos parecen masa de ribosomas involucrados en la síntesis de proteínas, existen ribonucleoproteínas en orden helicoidal en el citoplasma. Tienen vacuolas de glicógeno y al parecer no tienen mitocondrias (2,4).

IV.- CICLO BIOLÓGICO

El quiste de E. histolytica puede sobrevivir fuera del huésped semanas o meses en medio ambiente húmedo y cuando es ingerido provee al parásito de protección contra la acidez gástrica normal. Después de la ingestión sigue el desenquistamiento en el intestino delgado o en el intestino grueso. El núcleo se divide para formar ocho núcleos (estado de metaquiste) siguiendo una división citoplásmica,

originando finalmente ocho trofozoítos amibianos. La población de trofozoítos, entonces se aloja en el intestino delgado donde la invasión puede ocurrir. Individuos infectados excretan arriba de 45 millones de quistes por día (9).

V.- CULTIVO

E. histolytica fué cultivada primero por Boeck y Drobhlav en 1925, quienes utilizaron un medio difásico: una fase sólida y una fase líquida. Al año siguiente Dobell y Laidlow formularon un medio difásico que contenía: suero de caballo, solución Ringer y almidón (referido en 2). Este medio es aún usado para aislar y/o prolongar cultivos de E. histolytica en asociación con otros organismos (cultivos polixénicos). También fué desarrollado un medio monofásico por Balamuth y Nelson utilizado para el aislamiento directo de amibas de materia fecal. Ambos tipos de medio contienen: suero, huevo de gallina y bacterias como fuente de nutrición, factores de crecimiento y almidón de arroz que estimula el crecimiento y replicación de las amibas (referido en 2). La inoculación del medio difásico con partes de materia fecal, conteniendo una mezcla de flora bacteriana da como resultado el cultivo de amibas xénico (amibas-bacterias). Para evitar el sobrecrecimiento de las bacterias en el cultivo, se agregan varios antibioticos.

Shaffer y Frye en 1948, desarrollan un medio monoxénico, en el cual la asociación de bacterias fué controlado mediante la adición de penicilina. Algunas modificaciones a este medio fueron realizadas por Reeves y colaboradores. Así mismo, identificó varios requerimientos para que E. histolytica creciera (hierro y vitamina B₆). Otros tipos de medios incorporando Trypanosoma y Crithidia como células asociadas han sido utilizados (referido en 2).

El desarrollo de técnicas para el cultivo axénico de amibas (sin otros parásitos o bacterias) ha sido de gran ayuda para el estudio de E. histolytica (4). El cultivo axénico fué reportado por primera vez en 1961 por Diamond (10). El medio que actualmente se utiliza es el TYI-S-33 (tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero) desarrollado en 1978 (5,11).

VI.- DIAGNOSTICO

Dado que el ciclo de vida de E. histolytica involucra su presencia en el intestino delgado y la emisión de quistes o trofozoítos en las excreciones, el análisis de heces para detectarlos es de gran importancia en el diagnóstico de una supuesta infección intestinal (12). El exámen de muestras puede ser realizado por técnicos adiestrados quienes son capaces de diferenciarla entre otros parásitos protozoarios, helmintos, bacterias, levaduras, otras amibas intestinales y macrofagos (2).

Los quistes se encuentran comúnmente en las muestras de heces, las cuales pueden ser fijadas con alcohol polivinílico (PVA) y después teñidas (12). El diagnóstico de E. histolytica se establece en base a diferencias morfológicas, siendo su estructura nuclear la más característica en amibas entéricas. El trofozoito de E. histolytica usualmente tiene un núcleo con cromatina periférica y un endosoma pequeño localizado en el centro. El quiste tiene de uno a cuatro núcleos, los cuales son más pequeños que el del trofozoito pero similares morfológicamente (2).

El uso de técnicas inmunológicas para diagnosticar la amibiasis ha ido aumentando con el conocimiento inmunológico de las amibas (1,13). Las pruebas serológicas se utilizan de manera conjunta con el método directo de identificación de las amibas en heces (14). Las pruebas serológicas más comúnmente utilizadas son:

- | | |
|-----------------------------------|-------------|
| 1.- inmunodifusión Duchterlony | (ID) |
| 2.- contrainmunolectroforesis | (CIEP) |
| 3.- inmunofluorescencia indirecta | (IIF) |
| 4.- hemaglutinación indirecta | (IHA) |
| 5.- inmunoensayo enzimático | (ELISA-EIA) |

No obstante, las pruebas serológicas tienen algunas desventajas: existe una gran variación de resultados entre una prueba y otra, esto debido a que se trata de comparar datos obtenidos con diferentes preparaciones antigénicas con distintos criterios para la lectura de las pruebas y la clasificación de pacientes (1). Además las pruebas serológicas utilizan sueros policlonales que son una mezcla heterogénea de anticuerpos, que muchas veces no tienen la suficiente especificidad ni sensibilidad, aspecto que es muy importante para el inmunodiagnóstico (15).

VII.- ANTECEDENTES

Algunos procesos biológicos de E. histolytica se han relacionado con su patogenicidad, dentro de estos se encuentran la fagocitosis, la movilidad, la adherencia y la secreción (8). Durante la infección amibiana sintomática, las amibas destruyen las células y los tejidos del huésped, a través de la producción y liberación de sustancias citolíticas (16,17,18,19,20,21,22), hidrolíticas (23,24,25,26), el ameboporo (27,28,29), lisosomas amibianos (30) y la actividad de colagenasa (31).

La mayor parte de la matriz extracelular, esta constituida de una compleja mezcla de componentes tales como, proteínas colagénicas y no colagénicas (32), siendo la colágena uno de los principales componentes.

Se ha demostrado que los trofozoítos poseen una actividad colagenolítica, que puede estar localizada en la membrana plásmatica de la amiba (33). Esta colagenasa es específica para la colágena tipo I y podría jugar un papel importante en la destrucción de los tejidos (31).

La correlación lineal entre virulencia, medida como la capacidad de producir abscesos hepáticos en hamsters recién nacidos (34) y la actividad colagenolítica, apoya la sugerencia de que esta enzima participa en la invasión de los tejidos (31).

Estudios en nuestro laboratorio, acerca de la localización de esta enzima han demostrado que la amiba (cepa HM-1) secreta unos granulos electrodensos (GED) los cuales contienen a esta colagenasa (35).

Una gran mayoría de estudios, se han realizado con cepas de E. histolytica de cultivos axénicos, no obstante la amiba se encuentra in vivo en asociación con microorganismos. Tal asociación podría ser un factor adicional de la patogenicidad del parásito, por esta razón algunos investigadores han realizado estudios comparativos de ultraestructura, bioquímica y citoquímica de las amibas en cultivo axénico, monoxénico y polixénico (36,37,38,39,40).

Se tienen algunos conceptos acerca del papel de las bacterias en cultivo con las amibas: uno postula que la flora bacteriana puede proveer las condiciones necesarias de

anaerobiosis o de potencial redox (41), otro concepto menciona que los productos del metabolismo bacteriano son utilizados por la amiba (41) y un tercer concepto, sugiere que la flora bacteriana puede aportar sistemas enzimáticos, los cuales la amiba necesita para digerir material alimenticio en el medio (41). Se ha demostrado que los mecanismos moleculares de la adhesión bacteriana a los trofozoítos de E. histolytica y la adhesión de los trofozoítos a otras células es a través de lectinas (42).

Debido a la importancia de la actividad colagenolítica en cepas axénicas (31) y las condiciones en que la amiba se encuentra in vivo, resulta de gran interés la elaboración de un estudio, en cuanto a la actividad de colagenasa de las cepas de E. histolytica de cultivo polixénico, provenientes de pacientes asintomáticos y sintomáticos. Particularmente, debido a que la colagenasa se ha sugerido que es un factor importante en la virulencia del parásito.

C.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad colagenolítica en las diferentes cepas de cultivo polixénico de Entamoeba histolytica que provienen de pacientes asintomáticos y sintomáticos, para establecer si existe alguna relación entre esta actividad enzimática y la patogenicidad de cada una de las cepas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1).- Comparar la actividad colagenolítica entre las cepas de cultivo polixénico, aisladas de pacientes asintomáticos y sintomáticos.
- 2).- Estudiar la heterogenicidad de estos cultivos mediante el uso de gradientes de Percoll.

D.- MATERIAL

CEPAS DE ENTAMOEBAS: Proporcionadas por Margarita de la Torre
Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

CEPA	CULTIVO	FUENTE:PACIENTE	PROCEDENCIA
HM-1	AXENICO	SINTOMATICO	I M S S
HM-43	POLIXENICO	ASINTOMATICO	I M S S
HM-44	POLIXENICO	ASINTOMATICO	I M S S
HM-46	POLIXENICO	ASINTOMATICO	I M S S
HM-48	POLIXENICO	SINTOMATICO	I M S S

I.- CULTIVO AXENICO

Medio TYI-S-33 Diamond (5)

Para 1000 ml de medio de cultivo :

Biotriptasa	30 g
Dextrosa	10 g
Cloruro de sodio	2 g
KH ₂ PO ₄	0.6g
K ₂ HPO ₄	1 g
L-cisteina	1 g
ácido ascórbico	0.2g
citrato férrico de amonio	0.023g

Se pesaron las cantidades arriba mencionadas y se disolvieron en agua bidestilada hasta 500 ml, se ajusto el pH a 6.8 con NaOH 1 N (se peso 20 g de NaOH y se aforó con 500 ml de agua bidestilada) se aforó a un volumen de 820 ml y se esterilizó por autoclave a 121°C 15 lb/in² durante 15 minutos. El medio TYI-S-33 se complementó con suero bovino inactivado (se colocó en un baño de agua a 56°C durante 30 minutos con agitación constante) y con vitaminas de Diamond.

II.- CULTIVO POLIXENICO

Se llevó a cabo en medio de Boeck y Drobhlav, modificado por Margarita de la Torre (43).

Consta de dos fases: una sólida que consiste en una suspensión coagulada de huevo de gallina, sangre y una fase líquida, la cual contiene solución Ringer estéril más suero bovino al 3%, a estas se les añadieron las amibas y se les agregó una porción pequeña de arroz estéril.

SOLUCION RINGER

Para 1000 ml de solución:

Cloruro de sodio	8 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Bicarbonato de sodio	0.2 g
Cloruro de calcio	0.2 g
Cloruro de magnesio	0.010g

Se pesaron las cantidades mencionadas y se aforaron con agua bidestilada, a un volumen final de 1 litro. El pH final fluctua entre 6.5 - 7.0.

ALMIDON DE ARROZ

Se esterilizaron de 2 a 3 g de almidón de arroz en frascos de boca ancha con tapón de rosca de poca capacidad, en un horno a 150°C por 2.5 horas. Se guardo a temperatura ambiente.

III.-EXTRACCION DE COLAGENA

Acido acético 0.25 M

Se tomaron 15.01 ml de ácido acético y se aforó con 1 litro de agua bidestilada.

Pepsina 1:60,000 (0.25 mg/ml)

Se pesaron 250 mg de pepsina, se disuelven en 20 ml de agua destilada y se aforó a 1 litro con ácido acético 0.25 M.

NaOH 1 N

Se pesaron 40 g de NaOH, se disolvieron y aforaron en agua bidestilada hasta completar un volumen de 1 litro.

Tubos de diálisis

50ft., 90mm 3787-f 77

Solución amortiguadora de Tris-HCl 0.05 M, NaCl 1.7 M

pH 7.2:

Se pesaron 6.057 g de tris, 99.348 g de NaCl y se disolvieron en agua bidestilada, aproximadamente 800 ml, se les ajustó a pH 7.2 con HCl concentrado y se aforó a 1 litro.

Solución amortiguadora de Tris-HCl 0,05 M, NaCl 2.5 M

pH 7.2:

Se pesaron 6.057 g de Tris, 146.1 g de NaCl y se disolvieron en agua bidestilada 800 ml, se le ajustó a pH 7.2 con HCl concentrado y se aforó a 1 litro.

Solución amortiguadora de Tris-HCl 0.05M, NaCl 4 M pH 7.2:
Se pesaron 6.057 g de Tris, 233.76 g de NaCl y se
disolvieron en agua bidestilada 800 ml, se le ajustó a pH
7.2 con HCl concentrado y se aforó a 1 litro.

Liofilizado

Mezcla de acetona-hielo seco, se congelaron las y muestras
se colocaron en la liofilizadora.

IV.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DODECIL SULFATO DE SODIO (PAGE - SDS).

AGAROSA 1%

Se pesó 1 g de agarosa, se disolvió y aforó a 100 ml de agua
bidestilada.

ACRILAMIDA 30%

Se pesaron 15 g de acrilamida y se disolvieron en 50 ml de
agua bidestilada. Se almacenó a 4°C.

BIS-ACRILAMIDA 1%

Se pesaron 0.5 g de bis-acrilamida y se disolvieron en 50 ml
de agua bidestilada. Se almacenó a 4°C.

Tris-HCl 2 M pH 8.7

Se pesaron 22.4 de tris, se disolvieron en 60 ml de agua
bidestilada. El pH se ajustó a 8.7 con HCl concentrado y se
aforó a 100 ml con agua bidestilada. Se almacenó a 4°C.

Tris-HCl 1 M pH 6.8

Se pesaron 12.1 g de tris, se disolvió en 60 ml de agua bidestilada. El pH se ajustó a 6.8 con HCl concentrado y se aforó a 100 ml con agua bidestilada. Se almacenó a 4°C.

DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS) 20%

Se pesaron 20 g de SDS, se disolvieron y aforaron a 100 ml con agua bidestilada.

PERSULFATO DE AMONIO 10%

Se pesaron 10 mg de persulfato de amonio y se disolvieron en 100 µl de agua bidestilada.

N,N,N',N'-TETRAMETILETILENODIAMINA (TEMED)**AMORTIGUADOR DE MUESTRAS (10X)**

Se mezclaron 0.15 g de tris, 2.5 ml de SDS al 20%, 2 g de glicerol y 2 mg de azul de bromofenol, se ajustó el pH a 8.3 con HCl concentrado y se aforó a 10 ml con agua bidestilada.

AMORTIGUADOR DE CORRIDA (5x)

Se mezclaron 15.13 g de tris, 72.06 g de glicina y 5 g de SDS, la mezcla se ajustó a un pH de 8.3 y se aforó a 1000 ml de agua bidestilada.

	GEL CONCENTRADOR 3%	GEL SEPARADOR 12.5%
	ml	ml
ACRILAMIDA	0.5	4.16
BIS-ACRILAMIDA	0.4	1.68
TRIS-HCL 1M pH 6.8	0.625	----
TRIS-HCL 2M pH 8.7	----	3.75
H ₂ O	3.4	0.278
PERSULFATO DE AMONIO 10%	0.025	0.060
SDS 20%	0.025	0.05
TEMED	0.010	0.008

SOLUCION TENIDORA DE GELES

Se pesaron 1.25 g de azul de coomassie G-250 y se mezclaron con 227 ml de metanol absoluto, 227 ml de agua bidestilada y 46 ml de ácido acético glacial. Se almacenó a temperatura ambiente.

SOLUCION DESTENIDORA DE GELES

Se mezclaron 600 ml de etanol absoluto en 200 ml de ácido acético glacial y se aforó a 2000 ml con agua bidestilada.

V.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA DE LA COLAGENA TIPO I

REACTIVO DE FOLIN

Na₂CO₃ al 2% disuelto en NaOH 0.1 N: se pesaron 2 g de Na₂CO₃, 400 mg de NaOH, se disolvieron y aforaron en agua bidestilada hasta completar un volumen final de 100 ml.

TARTRATO DE SODIO Y POTASIO 2%

Se pesaron 2 g de tartrato de sodio y potasio, se aforó en 100 ml de agua bidestilada.

SULFATO DE COBRE 1%

Se pesó 1 g de sulfato de cobre y se aforó a 100 ml de agua bidestilada.

REACTIVO DE FENOL

Folin-Ciocalteu más agua destilada (1:1 V/V).

VI.- ENSAYO DE LA ACTIVIDAD COLAGENOLITICA

Medio TYI-S-33 modificado (sin suero y sin L-cisteina). Para 1000 ml de medio de cultivo:

BIOTRIPTASA	30 g
DEXTROSA	10 g
CLORURO DE SODIO	2 g
KH ₂ PO ₄	0.6g
K ₂ HPO ₄	1 g
ACIDO ASCORBICO	0.2g
CITRATO FERRICO DE AMONIO	0.023g

Se pesaron las cantidades arriba mencionadas y se añade agua bidestilada hasta \approx 820 ml, se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 1 N (se pesaron 20 g de NaOH y se aforaron en 500 ml de agua bidestilada) se aforó a un volumen de 1 litro y se esterilizó por autoclave. Por cada 100 ml de medio TYI-S-33 modificado se añadió 500 μ l de CaCl₂ 0.1 M estéril (se pesó 1.47 g de CaCl₂ y se disolvió, aforandose en agua bidestilada hasta completar un volumen final de 100 ml luego se esterilizó por autoclave) y se le adicionaron 600 μ l de antibiotico.

ACIDO ACETICO 0.25 M

Se preparó como ya se ha descrito.

TUBOS DE DIALISIS

100 ft. 11 mm 3787 - h47

SOLUCION AMORTIGUADORA DE TRIS-HCL 0.5 M pH 7.2

Se pesó 60.57 g de tris, se disolvió en agua bidestilada \approx 800 ml y se le ajustó a pH 7.2 con HCl concentrado, se aforó a 1 litro.

CAJAS FALCON

De 96 pozos con fondo plano

SOLUCION RINGER ESTERIL MAS ANTIBIOTICO

La solución Ringer se esterilizó por autoclave y a cada 100 ml de solución Ringer se le agregaron 600 μ l de antibiotico.

ENVOLTURA AUTOADHERENTE

Kleen-Pack

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINOS PARA AMIBAS (PBS-A)

- I) 50 ml de solución amortiguadora de fosfatos 300 mM
 - II) 58 ml de cloruro de sodio 3.08 M
- I) Preparación del fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)
300 mM: se pesaron 81.65 g, se disolvieron en agua bidestilada y se aforó a 2 litros.

Preparación del fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)
300mM: se pesaron 107.51 g de la sal, se disolvieron en agua bidestilada y se aforó a 2 litros. En el potenciómetro se agregó a la solución dibásica poco a poco la solución amortiguadora monobásica hasta llegar a un pH 7.0

II) Se pesaron 179.99 g de NaCl, se disolvieron y se aforó en agua bidestilada hasta completar un volumen de 1 litro

GLUTARALDEHIDO 2.5%

Se tomaron 10 ml de glutaraldehido al 25% y se aforó con 90 ml de PBS-A para tener una concentración final de 2.5%.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE TRIS-HCL 0.05 M pH 7.2

Se pesaron 6.057 g de tris, se disolvieron en \approx 800 ml de agua bidestilada se le ajustó a pH 7.2 con HCl concentrado y se aforó a 1 litro.

ROJO DE SIRIO 1%

Se calentó agua destilada 500 ml y se le agregó poco a poco ácido picrico hasta saturar. Se pesó 1 g de rojo de sirio, se disolvió en la solución saturada de ácido picrico y se aforó a 100 ml.

HCL 0.1 N

Se tomaron 1.823 ml de HCl concentrado y se aforó a 500 ml de agua bidestilada.

NaOH 0.01 N - Metanol absoluto

Se pesaron 0.040 g de NaOH, se disolvieron y aforó en 100 ml de agua bidestilada. Se mezcló con metanol absoluto (1:1 V/V).

VII.- SEPARACION MEDIANTE PERCOLL

Solución Ringer 10x:

COLORURO DE SODIO	0.8 g
COLORURO DE POTASIO	0.020g
BICARBONATO DE SODIO	0.020g
COLORURO DE CALCIO	0.020g
COLORURO DE MAGNESIO	0.001g

Se pesaron las cantidades arriba mencionadas, se aforó con 10 ml de agua bidestilada y se esterilizó por autoclave.

PERCOLL (PVP)

VIII.- REACTIVOS

J.T. BAKER :

DEXTROSA, CLORURO DE SODIO, BICARBONATO DE SODIO, CLORURO DE CALCIO, CLORURO DE MAGNESIO, ACIDO ACETICO GLACIAL, ACETONA, ACIDO CLORHIDRICO, TARTRATO DE SODIO Y POTASIO, SULFATO DE COBRE, CARBONATO DE SODIO, ACIDO PICRICO, ETANOL Y GLICEROL.

BIO-RAD LABORATORIES :

TRIS (HIDROXIMETIL) AMINOMETANO, ACRILAMIDA, TEMED, AGAROSA, BIS-ACRILAMIDA, PERSULFATO DE AMONIO, SDS Y GLICINA

COSTAR :

CAJAS FALCON DE 96 POZOS CON FONDO PLANO.

MALLINCRODT :

CITRATO FERRICO-AMONIO.

MERCK :

FOSFATO DE POTASIO MONOBASICO, FOSFATO DE POTASIO DIBASICO, L-CISTEINA, ACIDO ASCORBICO, CLORURO DE POTASIO, HIDROXIDO DE SODIO, GLUTARALDEHIDO, METANOL ABSOLUTO Y FIBRA DE VIDRIO

NORTH AMERICAN BIOLOGICALS :

SOLUCION DE VITAMINAS DE DIAMOND.

SANFER :

ANTIBIOTICOS: TICAR Y CARBACIN.

SIGMA :

PEPSINA, FOLIN-CIOCALTEU, ROJO DE SIRIO, AZUL DE BROMOFENOL,
AZUL DE COOMASSIE.

THOMAS SCIENTIFIC :

TUBOS DE DIALISIS 100 ft 11mm 3787-h 47, 50 ft 90mm 3787-f77

BIOXON-PBL MICROBIOLOGY SYSTEMS :

BIOTRIPTASA.

PHARMACIA :

PERCOLL (PVP).

E.- METODOS

1.- Cepa axénica de Entamoeba histolytica cepa HM-1.

CULTIVO

En tubos de 16 x 125 mm con tapón de rosca se colocaron 10 ml de medio TYI-S-33 se esterilizaron por autoclave posteriormente se les agregó en condiciones estériles, 2 ml de suero de bovino (inactivado) más vitaminas (por cada 100 ml de suero se adicionaron 5 ml de vitaminas) y se les colocó una alícuota de 0.2 ml - 0.5 ml de un tubo (48 hrs a 72 hrs de crecimiento) colocado a 4°C durante 10 minutos. Por último los tubos se cerraron perfectamente, se agitaron e incubaron a 37°C.

Obtención de trofozoítos de la cepa HM-1 :

Los tubos se colocaron a 4°C por 10 minutos, después se agitaron suavemente y se colocó su contenido en tubos cónicos de centrifuga estériles, se centrifugó a 1000 revoluciones por minuto (rpm) durante 3 minutos, el sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en 5 ml de medio TYI-S-33 modificado, se colocó una alícuota en la cámara de Neubauer y se realizó el conteo de amibas, se centrifugó nuevamente a 1000 rpm por 3 minutos y la pastilla se resuspendió en medio TYI-S-33 modificado.

2.- Cepas Polixénicas de Entamoeba histolytica.

CULTIVO :

Se colocó un huevo de gallina por matraz y por cada huevo 5 ml de sangre, se colocan el número de huevos que se vayan a emplear en un matraz de 1 litro, que contenía pedazería de vidrio. Se agitó vigorosamente, hasta que los huevos quedaron mezclados homogéneamente, luego se agregó la cantidad de sangre correspondiente y se volvió a agitar. Posteriormente esto se filtró con una gasa, se colocaron 50 ml de la mezcla en matraces de 125 a 250 ml de capacidad y se les fabricaron tapones, por último se colocaron los matraces de 80°C a 82°C durante 30 minutos, se dejaron enfriar toda la noche y después se esterilizaron por autoclave. Una vez listos los matraces se procedió a resembrar. Se cubrió la capa huevo - sangre con solución Ringer estéril más suero de bovino al 3%, se le añadieron las amibas procedentes de tubos y se adicionó una asada de polvo de arroz estéril, se cubrió la boca del matraz con Parafilm y se incubaron a 37°C.

Obtención de trofozoítos de cepas polixénicas :

Del matraz de cada cepa se separó cuidadosamente el sobrenadante y el sedimento (que se depositó en la fase sólida), tanto el sobrenadante como el sedimento se filtraron en fibra de vidrio, con el propósito de retener el

detritus del medio, la fibra se lavó abundantemente con solución Ringer fría, para despegar las células que pudieran quedar retenidas. Esto fué centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante debe quedar libre de células, la pastilla se resuspendió en solución Ringer y se procedió a contar en la cámara de Neubauer, posteriormente se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos y las células se resuspendieron en solución Ringer. Todo se realizó a 4°C.

3.- Extracción de colágena.

La colágena fué obtenida de placenta humana, de acuerdo al método descrito por Rojkind (44). Una placenta de humano se lavó y cortó, luego se colocó en 500 ml de ácido acético 0.25 M conteniendo pepsina (0.25 mg/ml) y se incubó 24 horas a 4°C. Después se centrifugó a 5000 rpm por 2 horas a 4°C, el sobrenadante claro se decantó y neutralizo (pH 7.0) con NaOH 0.1 M para inactivar a la pepsina. El proceso de digestión de las fibras de colágena no soluble, se repitió en dos ocasiones más y los sobrenadantes claros se mezclaron para purificar los diferentes tipos de colágena. Estas fueron dializadas a 4°C contra una solución amortiguadora Tris-HCl 0.05 M pH 7.3 con 0.45 M de NaCl. Posteriormente, para obtener las colagenas tipo III, I y V se dializaron contra solución amortiguadora Tris-HCl 0.05 M pH 7.3 con 1.7, 2.5 y 4 M de NaCl respectivamente. Los precipitados se disolvieron, dializaron y se congelaron con una mezcla de acetona-hielo seco y se liofilizaron. Por último se almacenaron a 4°C.

La pureza de la colágena tipo I se comprobó mediante geles de poliacrilamida (45).

4.- Electroforesis en geles de poliacrilamida de la colágena tipo I.

Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12.5% - SDS acorde al método descrito por Laemli (45). El tamaño del gel fué de 5.5 cm de largo y 8 cm de ancho, la cámara electroforética que se empleó fué: Migthy Small II de Hoefer Scientific Instruments San Francisco. Para la realización de esta técnica, primero se ensambló la cámara de electroforesis. De la siguiente manera: se colocaron las placas de aluminio sobre la cámara, después se sobrepuso una placa de vidrio en cada una de las placas de aluminio, entre ambas se colocó una "costilla" de 0.5 mm de espesor, por último este dispositivo se presionó con un par de pinzas, después se procedió a sellar la cámara con agarosa al 1%, se colocó el gel separador al 12.5% después de que polimerizo se colocó el gel concentrador al 3% junto con un "peine" para formar los espacios (carriles) en donde se colocaron las muestras una vez polimerizado el gel. Se quitó el peine y se colocaron las muestras, las cuales fueron tratadas previamente: la concentración empleada fué de 1 mg de proteína en peso seco, se diluyó en un amortiguador 10x para muestras (100µl) se hirvió durante 3 minutos y después se colocaron sobre los carriles, con una microjeringa Hamilton (200 µl de capacidad) un volumen

final de 10 μ l. El amperaje que se utilizó para correr el gel concentrador fué de 15 miliamperes y para el gel separador fué de 25 miliamperes. El amortiguador empleado para la corrida de los geles fué 5x. Paralelamente a la muestra de proteína, se utilizaron para ser corridas en electroforesis proteínas de bajo peso molecular (marcadores de peso molecular) cuyos pesos en kilodaltones (kD) fueron de : 14.4, 20.1, 30, 43, 67 y 94

Preparandose como se mencionó anteriormente, teniendo en 100 μ l de amortiguador 20 μ l de marcadores de bajo peso molecular.

Una vez concluida la electroforesis, el gel fué despegado cuidadosamente de la cámara, utilizando un chorro de agua y una espátula. Posteriormente el gel fué incubado con una solución teñidora toda la noche a temperatura ambiente y con agitación. Luego el gel fué incubado durante 1 hora con una solución desteñidora. Una vez visulizados los marcadores de peso molecular y la proteína se procedió a tomar una placa fotografica (figura 1).

5.- La determinación de proteína, se hizo de acuerdo al método descrito por Lowry (46). Conforme se describe a continuación: Se colocó la solución de proteína cuya concentración se desconocía, así como la proteína usada para realizar la curva estandar (albumina sérica de bovino BSA)

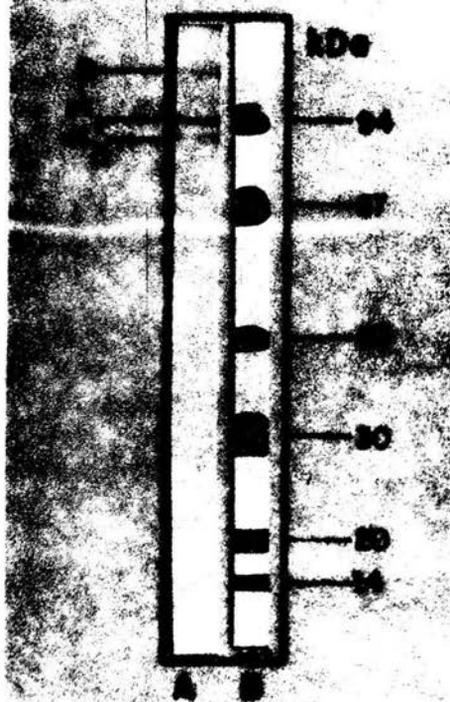


FIGURA # 1.

Electroforesis de la colágena tipo I.-

Se muestra el patrón típico de la colágena tipo I purificada de placenta de humano, conforme se describe en métodos (A) y los marcadores de peso molecular (B).

por separado, ambas fueron colocadas en agua destilada hasta completar un volumen final de 200 μ l. Se agregó con agitación 1 ml del reactivo de folin y se incubó por 10 minutos, luego se le agregó con agitación 0.1 ml del reactivo de fenol y se incubó por 30 minutos. Por último se leyó a 750 nm en un espectrofotometro. El blanco de cada determinación fué agua destilada, tratado de igual manera que la solución problema y la estandar. Todo se realizó por duplicado, con los datos obtenidos en el estandar se construyó una grafica de concentración de proteína contra absorbancia a 750 nm. En esta grafica se extrapolaron los datos obtenidos con la solución problema de proteína (colágena tipo I) y se les determinó su concentración.

6.- Ensayo de la actividad colagenolítica.

El ensayo consiste en breve: en cajas Falcon de 96 pozos con fondo plano, se colocaron 20 μ l de colágena tipo I (1.9 mg/ml), la cual previamente fué disuelta en ácido acético 0.25 M durante 2 horas, posteriormente la colágena se dializó contra una solución amortiguadora de Tris - HCl 0.5 M pH 7.2 por 2 horas, se incubó durante 1 hora a 37°C, para que polimerizara y se esterilizó durante toda la noche con luz UV. Estas películas se cubrieron con medio TYI-S-33 modificado para HM-1, colocando 1×10^5 y 2×10^5 trofozoítos por pozo por cuadruplicado, completando un volumen final de 200 μ l por pozo.

Para las cepas polixénicas, los pozos fueron cubiertos

con solución Ringer más antibiótico y se colocaron , 1×10^5 y 2×10^5 trofozoitos por pozo por cuadruplicado, completando un volumen final de 200 μ l por pozo. La caja se selló con papel autoadherente (Kleen-Pack), se incubó 16 horas a 37°C, después se fijaron con glutaraldehído al 2.5% por 1 hora, 2 pozos de cada cuadruplicado, tanto de HM-1 como de las cepas polixénicas y a los 2 pozos restantes se les despegaron las células con solución Ringer a 4°C para contarlas y los pozos se fijaron, posteriormente se lavaron con solución amortiguadora Tris-HCl 0.05 M pH 7.2 de 3 a 5 minutos. Después se teñieron con rojo de sirio al 1% durante 1 hora (47), se lavaron con HCl 0.1 N de 2 a 3 veces para quitar el exceso de colorante y se observó en un microscopio invertido (determinación cualitativa), finalmente el colorante fué eluido con una mezcla de metanol absoluto - NaOH 0.01 N (V/V) diluido 1/10 y se tomó lectura a 540 nm (48) en un espectrofotometro Beckman DU-7 (determinación cuantitativa).

En cada experimento se colocaron controles, que consistieron en pozos con la película de colágena incubados con la solución Ringer estéril más antibiótico y con sobrenadantes de los cultivos polixénicos, sin amibas. Las absorbancias que se obtuvieron en las determinaciones, fueron convertidas a μ g de proteína con la curva estandar de colágena. La proteína contenida en los pozos sin amibas menos la proteína detectada en los pozos, nos dio los μ g de proteína digerida.

7.- Curva estandar de colágena tipo I.

Una vez conocida la concentración de la proteína, se procedió a colocar distintas cantidades de colágena y se hizo una curva estandar, haciendo la determinación de colágena conforme se describió en los párrafos anteriores. Con los valores obtenidos se construyó una grafica, colocando en el eje de las X los μg de proteínas adicionados y en el eje de las Y los valores correspondientes de cada concentración en absorbancias a 540 nm (figura 2).

8.- Separación de las células mediante Percoll (PVP).

Después de ser filtradas y lavadas las amibas de cultivo polixénico, se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos, luego la pastilla se resuspendió en 1 ml de solución Ringer y fué colocado en tubo cónico (15 ml de capacidad) con gradientes de Percoll: 100%, 80%, 60%, 50%, 30%, 20% y 10% . Estos se prepararon de la siguiente manera: 9 partes de Percoll más 1 parte de solución Ringer 10x.

- 1).- 100% - 1 ml de la mezcla anterior
- 2).- 80% - 800 μl de la mezcla - 200 μl de solución Ringer
- 3).- 60% - 600 μl de la mezcla - 400 μl de solución Ringer
- 4).- 50% - 500 μl de la mezcla - 500 μl de solución Ringer
- 5).- 30% - 300 μl de la mezcla - 700 μl de solución Ringer
- 6).- 20% - 200 μl de la mezcla - 800 μl de solución Ringer
- 7).- 10% - 100 μl de la mezcla - 900 μl de solución Ringer

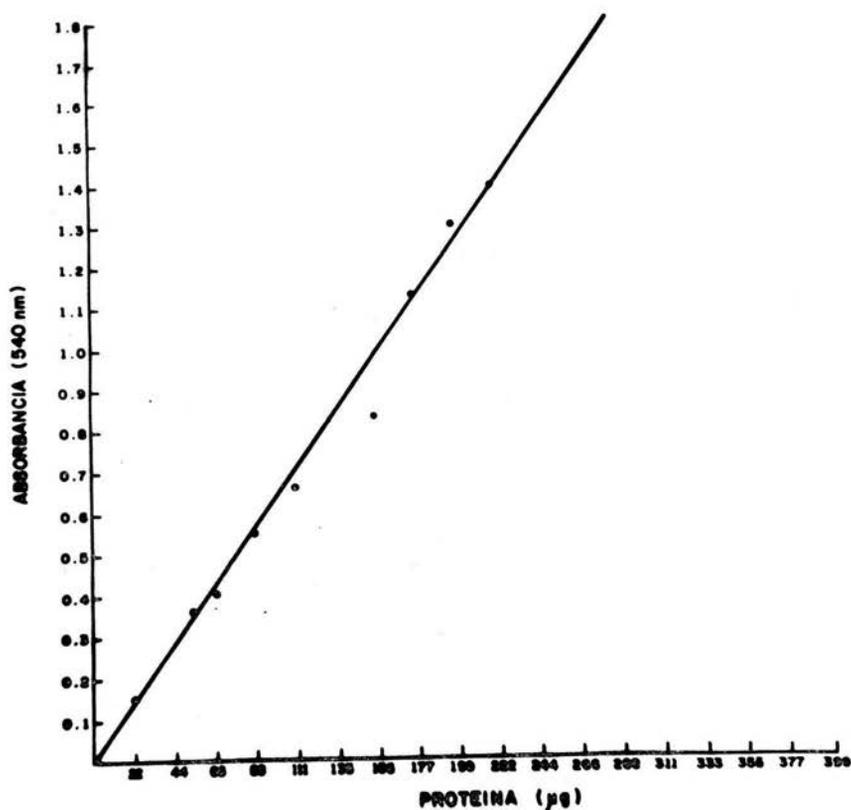


FIGURA # 2.

Curva estándar para determinar concentraciones de proteína de colágeno tipo I, por el método de rojo de sirio.-

La concentración de proteína de colágeno se relacionó con la absorbancia a 540 nm de rojo de sirio unido específicamente a la colágena pura, conforme se describió en métodos.

Se colocaron los gradientes de mayor a menor con pipeta Pasteur, se centrifugó a 1900 rpm durante 15 minutos y los anillos que se formaron se separaron cuidadosamente. Se observó cada uno de los anillos al microscopio, para detectar la presencia de amibas, las cuales se separaron del Percoll mediante lavados con solución Ringer, se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos y la pastilla se resuspendió, se hizo el ensayo de actividad colagenolítica. Se colocaron 5×10^4 células por cada pozo, por duplicado, un pozo fué fijado después de la incubación (16 horas) y el otro pozo se lavó con solución Ringer a 4°C y luego se fijó. La separación de células, mediante el Percoll fué llevada a cabo como lo describe Bracha et al, (49).

F.-RESULTADOS

1).- Actividad colagenolítica en trofozoítos de Entamoeba histolytica cepa axénica HM-1.

Para montar el ensayo de colagenasa en las cepas polixénicas, primero se probó este en trofozoítos de E. histolytica HM-1. En la figura 3, se muestra un aspecto general del ensayo de la actividad enzimática. Se determinó la digestión de colágena usando diferentes cantidades de células (figura 4). Se puede observar que la digestión aumenta, conforme se incrementa el número de trofozoítos.

2).- Actividad colagenolítica en trofozoítos de E. histolytica de cultivos polixénicos.

Se ha propuesto, que la actividad de colagenasa guarda una correlación directa con la virulencia de los trofozoítos de E. histolytica por lo tanto, estudiamos si esto es cierto para trofozoítos mantenidos en cultivos polixénicos. Esta enzima, se evaluó en 3 cepas provenientes de pacientes asintomáticos (HM-43, HM-44 y HM-46) y una cepa de un paciente que presentó absceso hepático y colitis amibiana (HM-48). Para lograr este objetivo, se colocaron : 1×10^5 y 2×10^5 trofozoítos de cada una de las cepas de cultivo polixénico y se incubaron por 16 horas, conforme se mencionó en métodos. Para la detección de actividad de colagenasa.

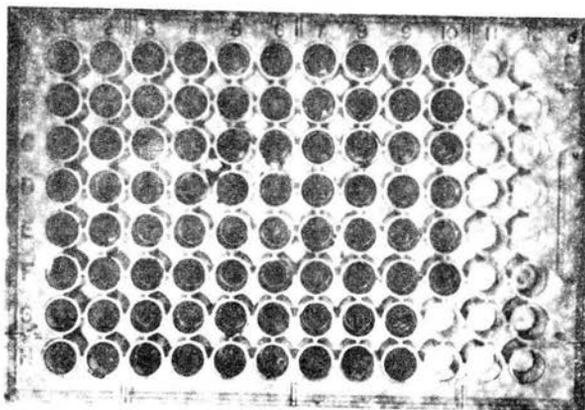


FIGURA # 3.

Ensayo de la colagenasa con rojo de sirio.-

Se muestra un ensayo típico del método para determinar la actividad de colagenasa. Se puede observar la coloración de la película de colágena antes de eluir el colorante.

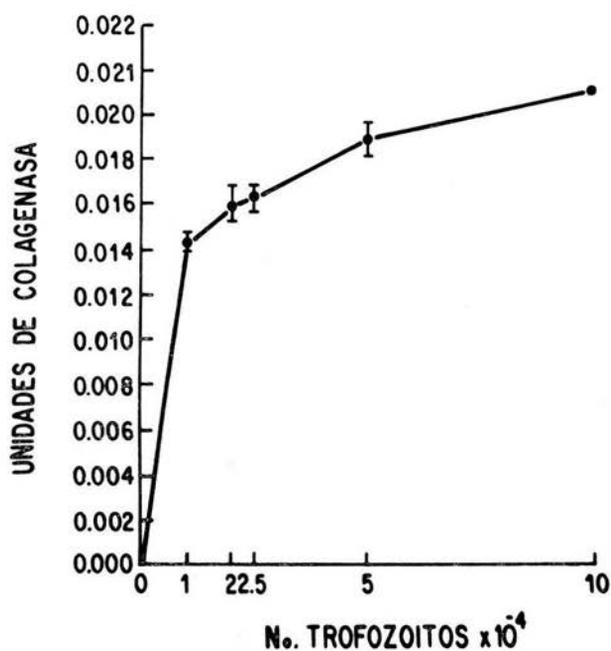
ACTIVIDAD DE COLAGENASA EN Entamoeba histolytica HM-1

FIGURA # 4.

Actividad colagenolítica de HM-1.-

Se colocaron distintas cantidades de trofozoitos de la cepa HM-1 realizandose el ensayo como ya se ha descrito. La actividad enzimática se presenta en unidades de colagenasa.

La actividad colagenolítica de cada una de estas cepas (HM-43, HM-44, HM-46 y HM-48) se observan en la figura 5, en unidades de colagenasa. Definiendose las unidades de colagenasa como 1 unidad = 1 μ g de colágena digerida en 1 minuto a 37°C (31). Los valores obtenidos corresponden a la actividad colagenolítica de 1×10^5 trofozoítos. Se incluyen los valores de la cepa axénica HM-1 como control positivo. El sobrenadante sin trofozoítos de los cultivos se empleo como control negativo. La digestión del gel de colágena por estos fluctúa entre un 10% y un 15%. Por lo tanto todos los valores se corrigieron restando estos porcentajes según correspondiera.

En la figura 6, se presentan las unidades de colagenasa correspondientes a 2×10^5 trofozoítos de las cepas de cultivo polixénicos (HM-43, HM-44 y HM-48) y de la cepa HM-1. La digestión de un gel de colágena, por las amibas de los cultivos polixénicos, se visuliza en la figura 7 y el gel de colágena íntegro en los pozos sin células se presenta en la figura 8 y representa el 100% del gel de colágena.

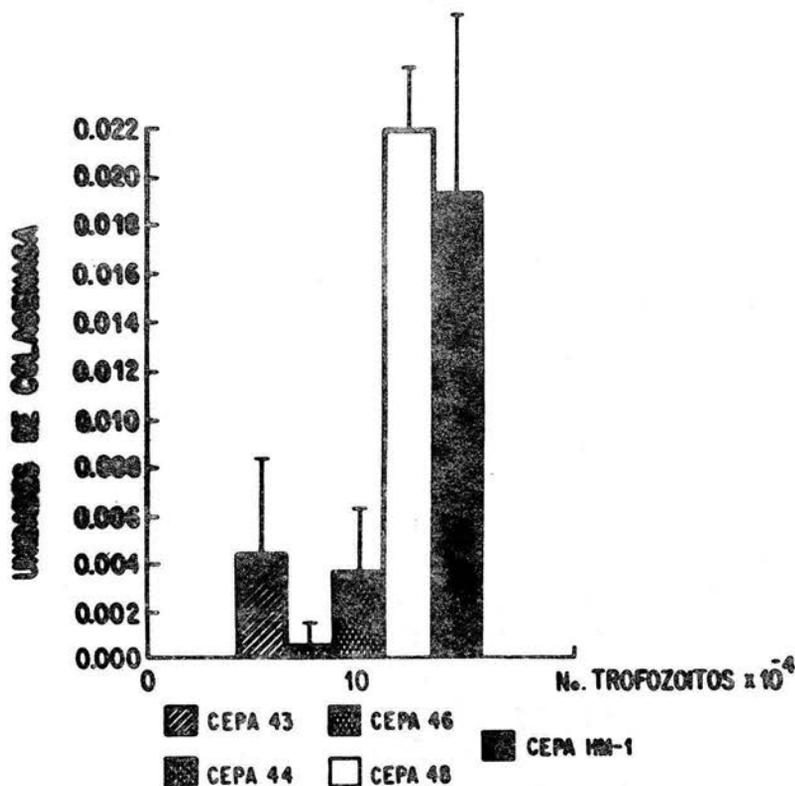


FIGURA # 5.

Actividad colagenolítica de cepas polixénicas.-

Una vez obtenido los trofozoitos de cepas polixénicas (HM-43, HM-44, HM-46 y HM-48) se colocaron 10⁹ células por pozo, cubierto con una película de colágena tipo y se incubaron durante 16 horas a 37°C. Se presentan los valores obtenidos en unidades de colagenasa, se incluye la cepa HM-1 como control positivo.

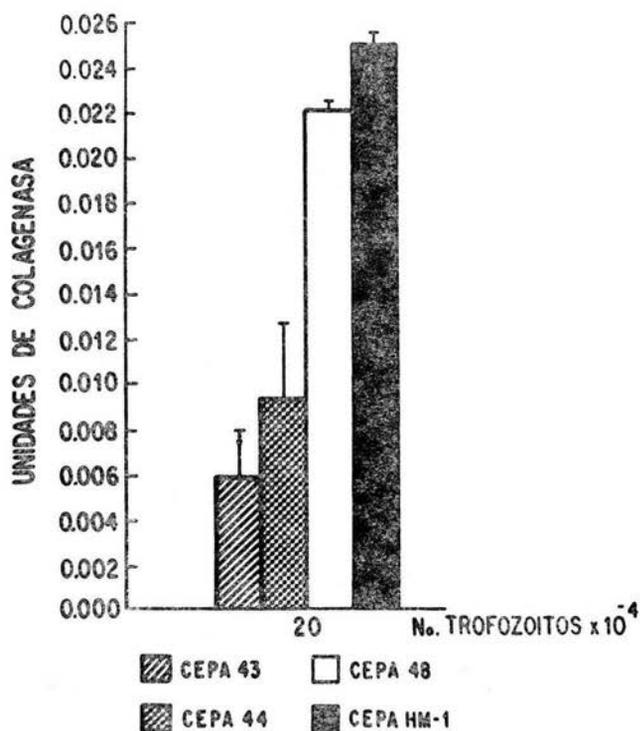
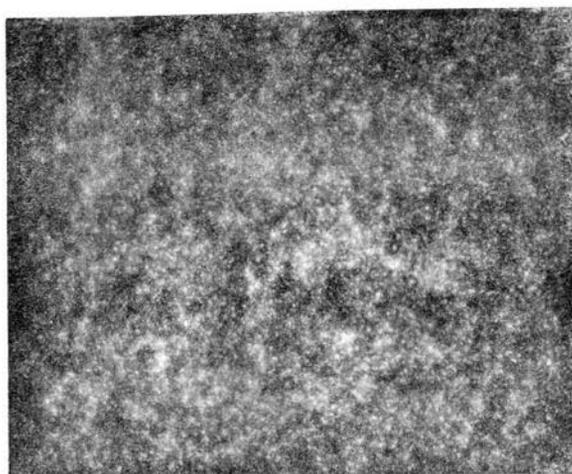


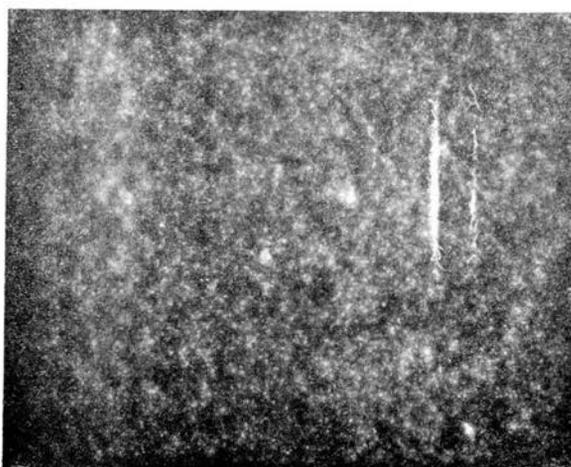
FIGURA # 6.

Actividad colagenolítica de cepas polixénicas.-

El experimento se realizó como en la figura # 5, pero se adicionaron 2×10^5 células.



A

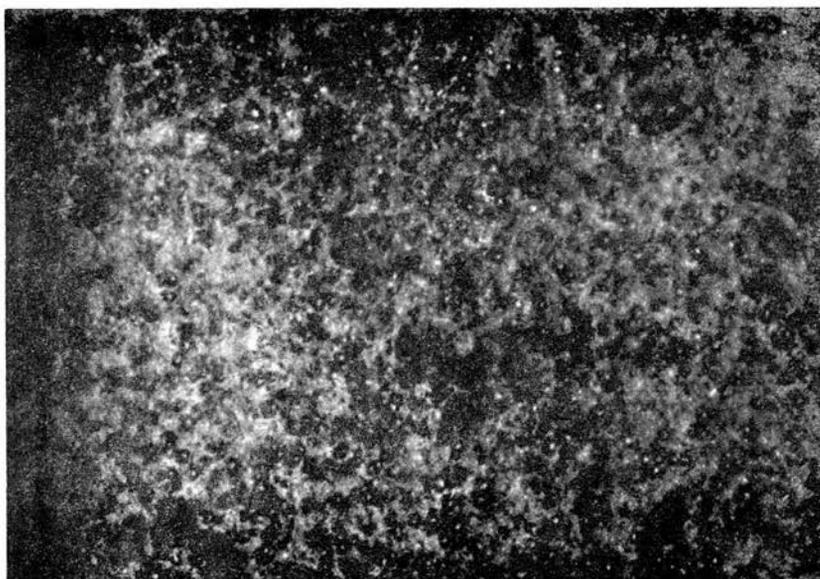


B

FIGURA # 7.

Microscopía de luz de la digestión de películas de colágena tipo I.-

Células de cepas polixénicas incubadas con los geles de colágena tipo I, fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5%. Posteriormente se tificaron con rojo de sirio y se observaron al microscopio. En A, B, y C se muestran las áreas de digestión por una de estas cepas en E. histolytica.



C

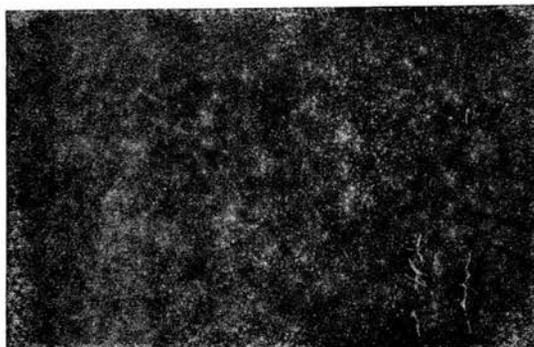


Figura # 8.

Gel de colágena tipo I.-

Para cada ensayo se colocó un gel de colágena tipo I, incubado con solución Ringer y sin células. La figura presenta un gel integro de colágena teñido con rojo de sirio, como control negativo. El colorante eluido de estas películas representó el 100 % de proteína y el 0 % de digestión.

3).- Heterogeneidad de las cepas polixénicas.

Con el objeto de afinar la metodología para la determinación de la actividad colagenolítica de trofozoítos de E. histolytica de cultivo polixénico se trato de eliminar el detritus y las bacterias (propias de estos cultivos), por medio de gradientes discontinuos de Percoll del 10% al 100%. Para nuestra sorpresa los trofozoítos también se separaron en función de su densidad y la mayor parte de las bacterias se quedo en la parte superior del gradiente. Se obtuvieron 6 anillos más una pequeña pastilla por cada cepa (figura 9). A cada una de las poblaciones obtenidas en cada uno de los anillos se les evaluó su actividad colagenolítica. Para lo cual se colocaron 5×10^4 amibas por pozo. Los resultados para cada una de las cepas (HM-43, HM-44, HM-46 y HM-48) se muestran en la figura 10. La cepa axénica HM-1, solo presentó células en el 4 anillo y su actividad enzimática se incluye en las gráficas. Un ejemplo de la digestión del gel por estas subpoblaciones se observa en la figura 11.

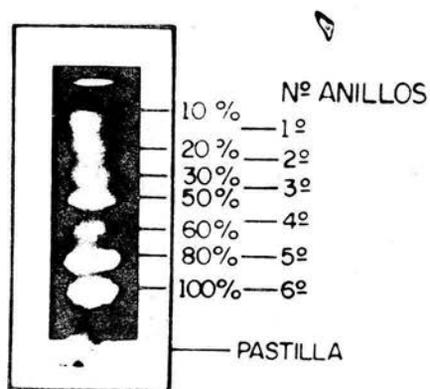


FIGURA # 9.

Gradientes de Percoll de las cepas polixénicas de *E. histolytica*.

Mediante un gradiente de Percoll discontinuo (10 % al 100 %) se separaron en 6 anillos y una pastilla, diferentes poblaciones de *E. histolytica* de los cultivos polixénicos. En esta figura se representan los % de Percoll empleados.

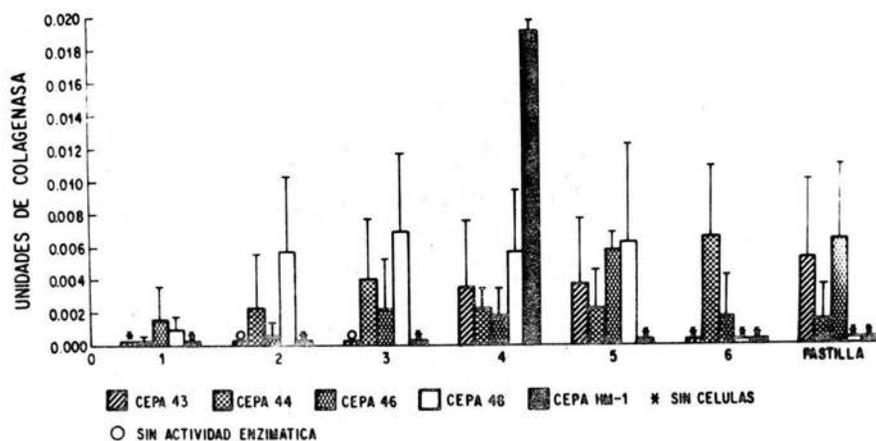


FIGURA # 10.

Actividad colagenolítica de los anillos de cada cepa. -

Las cepas de cultivo polixénico (HM-43, HM-44, HM-46 y HM-48) y de cultivo axénico (HM-1) fueron sometidas a gradientes de Percoll y la actividad enzimática de cada anillo y la pastilla fué evaluada, colocándose 5×10^4 células por pozo.

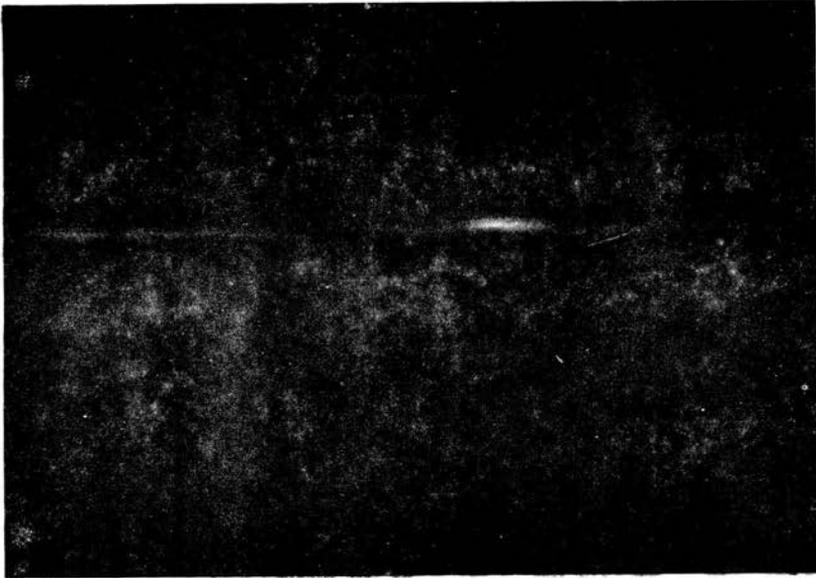


FIGURA # 11.

Digestión del gel de colágena por el anillo 4 del gradiente de Percoll.-

Las células separadas mediante el gradiente de Percoll (anillo 4) se incubaron con la película de colágena tipo I, conforme a la figura 10, se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % y se tñieron con rojo de sirio. Se puede observar un bajo nivel de bacterias y un enriquecimiento de los trofozoítos.

G.- DISCUSION

La actividad de colagenasa en trofozoitos de E. histolytica HM-1 fueron identicas a los reportados por Muñoz y colaboradores (31) lo que nos indico en principio que el método de detección de esta actividad era el adecuado. Así mismo se ha sugerido la importancia de esta enzima ya que, guarda una correlación directa con la virulencia de las diferentes cepas (31). Por lo tanto quisimos saber si esta relación también se guardaba en cepas aisladas de pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Nuestros resultados nos sugieren que las cepas de pacientes sintomáticos contienen una actividad colagenolítica equivalente a la cepa HM-1. Las cepas de pacientes asintomáticos presentaron todas una baja actividad de colagenasa. Esto nos sugirio dos posibilidades: I) Que las cepas de pacientes asintomáticos contienen una baja virulencia, ya que presentan una baja actividad de colagenasa ó II) Que se trata de una población heterogenea de trofozoitos con diferente virulencia y por lo tanto con diferente actividad de colagenasa.

La separación de diferente poblaciones por gradientes de Percoll nos permite sugerir que en cada cepa aislada tenemos una población heterogenea de trofozoitos con diferente actividad de colagenasa y probablemente con diferente virulencia, ya que incluso nos fué posible

detectar trofozoítos sin actividad de colagenasa (figura 10). Para definir esta relación de virulencia en el futuro será necesario probar la virulencia de estas poblaciones por inducción de absceso hepático amibiano en animales experimentales.

Curiosamente los trofozoítos separados alrededor de la misma densidad que la cepa HM-1, fueron las que presentaron mayor actividad de colagenasa. El hecho de haber encontrado subpoblaciones con actividad colagenolítica en las cepas aisladas de pacientes asintomáticos sugiere que el mayor porcentaje de trofozoítos provenientes de pacientes asintomáticos probablemente sean cepas de E. histolytica no-patógena, manteniendo un bajo nivel de las cepas patógenas. De manera contraria las aisladas de pacientes sintomáticos contienen un mayor porcentaje de trofozoítos patógenos y un pequeño porcentaje de los no-patógenos.

Estudios futuros nos aclararan si la patogenicidad es desarrollada dentro del huesped por un solo tipo de E. histolytica ó si existen 2 tipos genéticos de E. histolytica una patógena y otra no-patógena y si las condiciones del huesped determinan cual de ellas crece preferentemente.

H.- CONCLUSIONES

En base a los resultados del presente trabajo, podemos concluir:

- 1).- Que la actividad colagenolítica, esta relacionada con la patogenicidad de E. histolytica en cepas de cultivo polixénicos.
- 2).- Que los trofozoítos de cultivos polixénicos son poblaciones heterogeneas de las cuales, se pueden diferenciar dos tipos de subpoblaciones unas con actividad de colagenasa y otras sin esta actividad, lo cual sugeriría dos tipos de Entamoeba las patógenas y las no-patógenas.
- 3).- En trofozoítos de E. histolytica provenientes de cultivo polixénico se puede emplear como marcador de patogenicidad a la actividad de colagenasa.

I.- BIBLIOGRAFIA

- 1).- Trissl D. Immunology of Entamoeba histolytica in human and animal hosts. Rev. Inf. Dis. 4: 1154 - 1184, 1982.
- 2).- Albach, R.A. Booden T. Amoebae. In Parasitic Protozoa. Kreier P.J. (ed) Academic Press, New York, 2: pp.445-506, 1978.
- 3).- Guerrant L. Richard. The global problem of amebiasis: Current status, research needs, and opportunities for progress. Rev. Inf. Dis. 8: 218-226, 1986.
- 4).- Ravdin I. Jonathan and Guerrant L. Richard. A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. Rev. Inf. Dis. 4: 1185-1206, 1982.
- 5).- Diamond L.S., Harlow D.R., Cunnick C.C. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 431-432, 1978.
- 6).- Levine N. D., Corliss J.O. A newly revised classification of the protozoa. J. Protozol 56: 496-499, 1962.

- 7).- Noble, E.R., Noble, G.A. Superclass Sarcodina, Subphylum Opalinata. In Parasitology. The biology of animal parasites. Lea & Febiger (ed) Great Britain. pp 55 - 70, 1976
- 8).- Ravdin J. Jonathan. Pathogenesis of disease caused by Entamoeba histolytica: studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. Rev. Inf. Dis. 8: 247-259, 1986.
- 9).- Barker D.C., Swales L.S. Characteristics of ribosomes during differentiation from trophozoite to cysts in axenic Entamoeba sp. Cell Differ 1: 297-306, 1972.
- 10).- Diamond, L.S. Axenic cultivation of Entamoeba histolytica. Science 134: 336-337, 1961.
- 11).- Diamond, L.S. Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903, and Entamoeba histolytica - like amebae. J Parasitol. 54: 1047-1056, 1968.
- 12).- Healy, R. G. Diagnostic Techniques for stool samples. In Amebiasis human infection by Entamoeba histolytica. Ravdin J. I. (ed) U.S.A. pp 635 -649, 1988.
- 13).- Salata, R.A., Ravdin, J.I. Review of the human immune mechanisms directed against Entamoeba histolytica. Rev. Inf. Dis. 8: 261, 1986

- 14).- Healy, R.G. Serology. In Amebiasis human infection by Entamoeba histolytica. Ravdin, J.I. (ed) U.S.A. pp 650-663, 1988.
- 15).- Cowley G.J. Aspectos básicos y avances recientes en la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales. Interferón y Biotecnología 4: 1-16, 1978.
- 16).- Craig, C.F. Observations upon the hemolytic cytolytic and complement - binding properties of extracts of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. 7: 225-240, 1927.
- 17).- Jarumilinta, R. y Kradolfer, F. The toxic effect of Entamoeba histolytica on leukocytes. Ann. Trop. Med. Parasitol, 58: 375-381, 1964.
- 18).- Bos, H.J. & Van de Griend, R.J. Variable toxicity within the HK-9 strain of Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. 9 (suppl) 167-174, 1978.
- 19).- Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Cantey, J.R., Hofbaver, A.F., Pittman, J.C. and Pittman, F.E. Cytotoxicity of cell-free extract of Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. 9 (suppl 1) 23-236, 1978.

- 20).- Bos, H.J. Entamoeba histolytica: Cytopathogenicity of intact amebae and cell - free extracts: isolation and characterization of an intracellular toxin: Exp. Parasitol. 47: 369-377, 1979.
- 21).- López-Revilla, R. & Said Fernández S. Cytopathogenicity of Entamoeba histolytica hemolytic activity of trophozoite homogenates. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29: 209-212, 1980.
- 22).- Ravdin, J.I., Croft, B.Y. and Guerrant, R.L. Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152: 377-390, 1980.
- 23).- Nakamura, M. & Goldstein, L. Occurrence of glutaminase in Entamoeba histolytica. Nature (London). 179: 1134, 1957.
- 24).- Harinasuta, C. & Mac Graith, B.G. The demonstrations of proteolytic enzyme activity of Entamoeba histolytica by the use of photographic film. Ann. Trop. Med. Parasitol. 52: 508 - 515, 1958.
- 25).- Nakamura, M. & Edwards, T.R. Enzymes of Entamoeba histolytica. I. Gelatinase. Proc. Exp. Biol. Med., 100: 403-404, 1959.

- 26).- Neal, R.A. Enzymic Proteolysis by Entamoeba histolyta Biochemical characteristics and relationship with invasiveness. Parasitol, 50: 531-550, 1960.
- 27).- Lynch, E.C., I. Rosenberg, C. Gitler. An-ion channel forming protein produced by Entamoeba histolytica. The EMBO Journal. 1: 801-804, 1982.
- 28).- Young, J.D-E., T.M. Young, L.P., Lu, J.P., Unkeless, Z.A., Cohn. Characterization of a membrane pore - forming protein from Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 156: 1677-1690, 1982.
- 29).- Young, D-E,J. and Cohn, Z.A. Molecular mechanisms of cytotoxicity mediated by Entamoeba histolytica: characterization of a pore - forming protein (PFP). J. Cell. Biochemistry. 29: 299-308, 1985.
- 30).- Long - Krug, S.A., Krista, J., Fisher, Robert, M., Hysmith and Ravdin, J.I. Phospholipase a enzymes of Entamoeba histolytica: description and subcellular localization. J. Inf. Dis. 152: 536-541, 1985.
- 31).- Muñoz, M.L., M. Rojkind, J. Calderón, M. Tanimoto, S. Arias-Negrete, A. Martínez-Palomo. Entamoeba histolytica: Collagenolytic activity and virulence. J. Protozool. 31: 468-470, 1984.

- 32).- Rojkind, M. and P. Ponce-Noyola. The extracellular matrix of the liver. *Collagen. Rel. Res.* 2: 151-175, 1982.
- 33).- Muñoz, M.L. Calderón, J. & Rojkind, M. The collagenase of Entamoeba histolytica. *J. Exp. Med.* 155: 42-55, 1982
- 34).- Mattern, C.F.T. & Keister, D.B. Experimental amebiasis II hepatic amebiasis in the newborn hamster. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 26: 402-411, 1977.
- 35).- Pérez García J. N. Caracterización de los granulos de secreción del parásito Entamoeba histolytica. Tesis de Licenciatura. ENEP IZTACALA - UNAM. CINVESTAV
- 36).- Chévez, A., Segura, M., Corona, D., e Iturbide-Alessio, I.,. Esférulas yuxtannucleares de Entamoeba histolytica, estudio morfológico y dinámico. *Arch. Inv. Med. Suppl 2*, 257-264, 1972.
- 37).- Fastas de Shor, A., Villegas-González, J., DeLa Torre M., and DeLa Hoz, R. Enzymatic activity of Entamoeba histolytica obtained from axenic and monoaxenic cultures. An *in vivo* and *in vitro* histochemical study. *Arch. Inv. Med.* 4 suppl 1: 115-125, 1973.

- 38).- Rosenbaum, R. M. and Wittner, M. Ultraestructure of bacterized and axenic trophozoites of Entamoeba histolytica with particular reference to helical bodies. J. Cell. Biol. 45: 367-382, 1970.
- 39).- S epulveda, B. Introductory remarks to the 4th seminar on amebiasis. Arch. Inv. Med. 3 suppl 2: 233-239, 1972.
- 40).- Sharma, N.N, Albach, R.A. and Shaffer, J.G. Cytochemical comparasion of distribution of proteins and lipids in axenically vs monoaxenically grown Entamoeba histolytica. Exp. Parasitol. 30: 215-223, 1971.
- 41).- Mirelman D. Ameba-bacterial relationship in amebiasis. In Amebiasis human infection by Entamoeba histolytica. Ravdin, J.I. (ed) U.S.A. pp 351 - 369. 1988.
- 42).- Kobilier, D., Mirelman, D. Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. Infect. Immun. 29: 221, 1980.
- 43).- De la Torre M., S epulveda, B. Avances en los métodos para el cultivo de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (México) 1 suppl 1:9, 1970.

- 44).- Rojkind, M., Giambone, M.A., Biempica, L. Collagen types in normal and cirrhot liver. *Gastroenterology*, 76: 710, 1979.
- 45).- Laemli, U.K. Cleavage of estructural proteins during the assembly of head of bacteriophage T 4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- 46).- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L. Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265 - 275, 1951.
- 47).- Junqueira, L.C.V., Bignolas, G., Brentani, R.R. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Anal. Biochem.* 94: 96-99, 1979.
- 48).- López, D.L. Rojkind M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin - fixed paraffina - embedded sections. *The journal of histochemistry and cytochemistry.* 33: 737-743, 1985.
- 49).- Bracha, Rivka, B.A, Deutsch, R.M. and Mirelman, D. Entamoeba histolytica and Entamoeba invadens: separation and purification of precysts and cysts by centrifugation on discontinuos density gradients of percoll. *Exp. Parasitology* 55: 265-269, 1983.