

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



COMPARACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA,  
FOSFOLIPASICA Y PRODUCCION DE ABSCESOS  
HEPATICOS DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA  
EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE VITAMINAS

POR

HECTOR GERARDO LOZANO GARZA

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
con Especialidad en Salud Animal

Septiembre, 2000





1020133293

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



COMPARACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA,  
FOSFOLIPASICA Y PRODUCCION DE ABSCESOS  
HEPATICOS DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA  
EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE VITAMINAS

POR

HECTOR GERARDO LOZANO GARZA

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
con Especialidad en Salud Animal

Septiembre, 2000

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA, FOSFOLIPASICA Y  
PRODUCCIÓN DE ABSCESOS HEPÁTICOS DE  
*Entamoeba histolytica* CULTIVADA  
EN PRESENCIA Y AUSENCIA  
DE VITAMINAS

Por

HECTOR GERARDO LOZANO GARZA

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS con  
Especialidad en Salud Animal

Septiembre, 2000

0138-02960

---

M  
Z6674  
FMVZ  
2000  
L6



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA, FOSFOLIPASICA Y  
PRODUCCION DE ABSCESOS HEPATICOS DE  
*Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN  
PRESENCIA Y AUSENCIA DE  
VITAMINAS.

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

M. V. Z. HECTOR GERARDO LOZANO GARZA

DIRECTOR EXTERNO



---

DR. JAVIER VARGAS VILLARREAL

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA, FOSFOLIPASICA Y  
PRODUCCION DE ABSCESOS HEPATICOS DE  
*Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN  
PRESENCIA Y AUSENCIA DE  
VITAMINAS.

TESIS  
QUE EN OPCION AL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA  
M. V. Z. HECTOR GERARDO LOZANO GARZA

DIRECTOR INTERNO



---

DR. VICTOR MANUEL RIOJAS VALDES

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA, FOSFOLIPASICA Y  
PRODUCCION DE ABSCESOS HEPATICOS DE  
*Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN  
PRESENCIA Y AUSENCIA DE  
VITAMINAS.

APROBACION POR EL COMITÉ DE TESIS:



---

DR. JAVIER VARGAS VILLARREAL

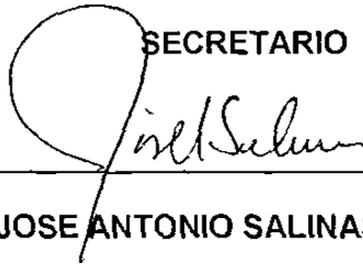
PRESIDENTE



---

DR. VICTOR MANUEL RIOJAS VALDES

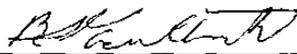
SECRETARIO



---

DR. JOSE ANTONIO SALINAS MELENDEZ

VOCAL



---

DR. BENITO DAVID MATA CARDENAS

VOCAL

*El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular así como en el Bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social y en el Laboratorio de la Unidad de Biotecnología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.*

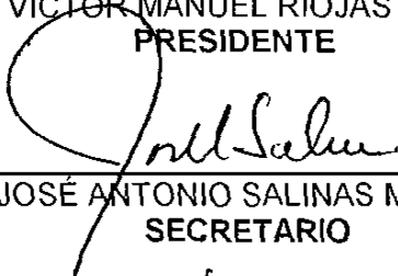
COMPARACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA, FOSFOLIPASICA Y  
PRODUCCIÓN DE ABSCESOS HEPÁTICOS DE  
*Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN  
PRESENCIA Y AUSENCIA DE  
VITAMINAS

APROBACION DE LA TESIS:



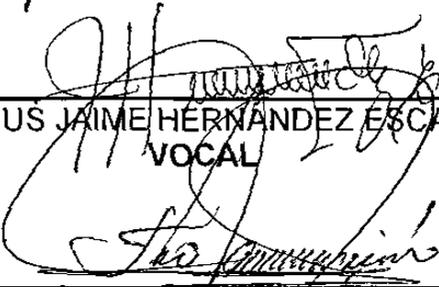
---

DR. VICTOR MANUEL RIOJAS VALDES  
PRESIDENTE



---

DR. JOSÉ ANTONIO SALINAS MELENDEZ  
SECRETARIO



---

M.C. JESUS JAIME HERNANDEZ ESCAREÑO  
VOCAL



---

M.C. FRANCISCO JAVIER PICONRUBIO  
SECRETARIO DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

## DEDICATORIA

A la memoria de mi padre **Sr. Humberto Lozano Villarreal** (Q.E.P.D.), Quien día a día supo infundir en mi su ejemplo de bondad, rectitud, honestidad y formalidad en cualquier cosa o proyecto que yo emprendiera.

A mi madre **Sra. Rosa Elia Garza Vda. de Lozano** ejemplo de fortaleza inquebrantable, de quien aprendí que con perseverancia, dedicación y esfuerzo se puede lograr conseguir cualquier cosa que uno se proponga en esta vida.

A la memoria de mi abuela materna (**Gueli**) **Sra. Amalia Alvarez de Garza** (Q.E.P.D.) ejemplo de disciplina, bondad, generosidad, cariño y amor, los recuerdos de mi infancia a su lado fueron y siguen siendo estimulantes en la formación de mi persona.

A **Yola** mi esposa **Sra. Yolanda Jiménez de Lozano** por su amor, cariño, entendimiento y apoyo que día a día me ha sabido brindar, sobre todo en los momentos difíciles que se presentaron en el transcurrir de este proyecto de tesis. Gracias por ser madre fiel, dura y enérgica pero también dulce y cariñosa en la educación de nuestros hijos.

A mis hijos **Yoly, Jessy y Gerardito**, gracias por ser excelentes estudiantes y mejores hijos al soportar los momentos que no pude pasar con ustedes por la realización de esta tesis.

A mis hermanos **Rosy, Beto, Pepe, Riqui y Mony**, que son cada uno de ellos ejemplo de superación en mi vida personal.

A **Dios** gracias, por darme la sapiencia y fortaleza para la consecución de este proyecto de tesis, y por rodearme de gente que me apoyo y animo para seguir adelante hasta su conclusión.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por medio de la Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia, por facilitarme los estudios así como instalaciones, equipo y material necesario para la realización de esta tesis.

Al Dr. José Antonio Salinas Meléndez, Director de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por su amistad y por darme todas las facilidades y el apoyo necesarios para la realización de esta tesis dentro de nuestra facultad.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por medio del Centro de Investigación Biomédica Del Noreste por brindarme su infraestructura, instalaciones y equipo necesario para la realización de esta tesis.

Al Dr. Salvador Saíd Fernández, Director del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social por sus enseñanzas, confianza, y por darme todo su apoyo para la realización de esta tesis dentro de nuestro Centro, y por la amistad que me ha brindado desde que lo conocí hace ya tantos años.

Al Dr. Víctor Manuel Riojas Valdés, maestro y director interno de esta tesis, por sus enseñanzas y consejos en la dirección de este trabajo y por su amistad de hace ya muchos años siendo aun alumno del CIBIN.

Al Dr. Javier Vargas Villarreal, gracias maestro, por su confianza, enseñanza y dedicación como director externo de tesis de este trabajo y por su entrañable amistad de tantos años.

De nuevo al Dr. José Antonio Salinas Meléndez, por su gran amistad y por brindarme todo su apoyo, consejos y asesoría para la elaboración de este trabajo de tesis.

Al Dr. Benito David Mata Cárdenas, por sus consejos, asesoría y atinadas observaciones en este trabajo de tesis y por su gran amistad de muchos años.

Al M.C. Francisco Javier Picón Rubio, Secretario de Postgrado e Investigación por su amistad y por brindarme todo su apoyo.

Al Dr. José González Salinas, por su amistad y dedicación en la corrección de este proyecto de tesis.

Al Dr. Gustavo Hernández Vidal, por su amistad y consejos en la corrección de esta tesis.

Al Dr. Ricardo Martín Cerda Flores, por su amistad y apoyo en la selección y realización del modelo estadístico realizado en esta tesis.

Al M. C. Miguel Ángel Zúñiga Charles por su amistad, apoyo y asesoría en el modelo estadístico llevado a cabo en esta tesis.

A la Dra. María Teresa González Garza y Barrón, por su amistad y por confiar en mi e invitarme a colaborar en cirugía experimental desde mis inicios.

Al Sr. Mateo Trejo Torres y Sr. Francisco Resendiz Rodríguez, por el cuidado y esmero que pusieron en el mantenimiento, manejo y cuidados de los animales de laboratorio utilizados en este proyecto de tesis.

A la Q.F.B. Leticia Navarro Marmolejo, por su amistad, compañerismo y apoyo de tantos años.

Al Sr. Manuel Gutiérrez Rueda, por su amistad y apoyo técnico en la preparación de material para la realización de esta tesis.

Al Dr. Antonio Luna de la Rosa y al Sr. Francisco Treviño González, por su amistad y buena labor en el trabajo gráfico y fotográfico de esta tesis.

A la Sra. María del Refugio Garza y al Sr. Abel Navarro por todas las facilidades otorgadas en la recuperación de referencias bibliográficas.

A los integrantes de la División de Biología Celular y Molecular.

Al personal, maestros y estudiantes del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del I.M.S.S.

Al personal, maestros y alumnos de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.A.N.L.

A mis tíos, Lupe, Amalia, Pera y Pepe, quienes formaron parte importante de mi niñez, sobre todo a mi tía Lupe con quien convivimos y nos divertimos grandemente en este periodo de nuestras vidas tanto mis hermanos como yo.

A mi sobrina Ely que decidió claramente cursar también la carrera de M.V.Z. mis mejores deseos y espero que algún día no muy lejano pueda estar presente en su examen profesional y de especialización en Equinos.

A todos mis parientes, compañeros y amigos, que de una forma o de otra me animaron y apoyaron a seguir adelante con este proyecto de tesis de maestría.

## TABLA DE CONTENIDO

| Capitulo   | Pagina |
|--|--------|
| 1. INTRODUCCIÓN . . . . .  | 1      |
| 1.1. Importancia de la Amibiasis. . . . .  | 1      |
| 1.2. Clasificación de <i>Entamoeba histolytica</i> . . . . .                                 | 2      |
| 1.3. Ciclo de vida . . . . .   | 3      |
| 2. ANTECEDENTES . . . . .  | 7      |
| 2.1. Vitaminas. . . . .  | 7      |
| 2.2. Virulencia de <i>E. histolytica</i> . . . . .   | 9      |
| 2.3. Actividad Hemolítica de <i>E. histolytica</i> . . . . .                                 | 11     |
| 2.4. Fosfolipasas. . . . .   | 12     |
| 2.4.1. Clasificación. . . . .  | 13     |
| 2.5. Actividad Fosfolipásica de <i>E. histolytica</i> . . . . .                              | 16     |
| 2.5.1. Métodos de Ensayo para Cuantificar y Determinar<br>Actividad de Fosfolipasas. . . . . | 17     |
| 2.6. Abscesos Hepáticos Amibianos. . . . .   | 18     |
| 2.7. Hipótesis. . . . .  | 20     |
| 2.8. Objetivo General. . . . .   | 20     |
| 2.9. Objetivos Específicos. . . . .  | 20     |
| 3. MATERIAL Y METODOS. . . . .   | 22     |
| 3.1. Material Biológico. . . . .   | 22     |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.1.1. | Cultivos Axénicos de <i>E. histolytica</i> de la Cepa HM1:IMSS. . . . .  | 22 |
| 3.1.2. | Obtención de Eritrocitos de Rata de la Cepa<br>Sprague Dawley. . . . .   | 23 |
| 3.1.3. | Hámsters. . . . .  | 23 |
| 3.1.4. | Método para la Obtención de Crías de Hámster<br>a nivel del Bioterio. . . . .  | 24 |
| 3.2.   | Trofozoítos Enteros. . . . .   | 25 |
| 3.3.   | Fracción Subcelular P30. . . . .   | 25 |
| 3.4.   | Detección de los Parámetros de Crecimiento de<br>los Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> Crecidas en Presencia<br>y Ausencia de Vitaminas 107 de Diamond. . . . .   | 27 |
| 3.5.   | Cuantificación de la Actividad Hemolítica . . . . .  | 28 |
| 3.6.   | Método para Determinar la Actividad Fosfolipásica. . . . .   | 29 |
| 3.7.   | Cuantificación de Proteínas. . . . .   | 30 |
| 3.8.   | Inducción de Abscesos Hepáticos Producidos por<br>los Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> Crecidas en Presencia<br>y Ausencia de Vitaminas 107 de Diamond. . . . .  | 31 |
| 3.9.   | Análisis Estadístico Empleado en este Trabajo. . . . .   | 32 |
| 4.     | RESULTADOS. . . . .  | 33 |
| 4.1.   | Cinética de Crecimiento de la Cepa HM1:IMSS<br>Cultivadas en Presencia y Ausencia de Vitaminas<br>107 de Diamond. . . . .  | 33 |
| 4.2.   | Caracterización de las Actividades Hemolíticas<br>de las Fracciones P30 Obtenidas de Amibas<br>Cultivadas en el medio PEHPSCV Y PEHPSSV. . . . .                     | 36 |
| 4.3.   | Caracterización de la Actividad Fosfolipásica del<br>tipo A <sub>2</sub> de las Fracciones P30 Obtenidas de Amibas<br>Cultivadas en Medio PEHPSCV Y PEHPSSV. . . . . | 39 |
| 4.4.   | Capacidad de las Amibas Cultivadas en PEHPSCV y<br>PEHPSSV para Producir Abscesos Hepáticos en   |    |

|                          |    |
|--------------------------|----|
| Hámsters. . . . .        | 43 |
| 5. Discusión. . . . .    | 46 |
| 6. Conclusiones. . . . . | 55 |
| 7. Perspectivas. . . . . | 56 |
| 8. Referencias. . . . .  | 57 |

## NOMENCLATURA

|                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| AGL              | Acidos grasos libres     |
| $\mu M$          | Concentración micromolar |
| mM               | Concentración milimolar  |
| M                | Concentración molar      |
| N                | Concentración normal     |
| $r^2$            | Correlación con la recta |
| DH <sub>50</sub> | Dosis hemolítica 50      |
| FC               | Fosfatidilcolina         |
| ° C              | Grados centígrados       |
| g                | Gramos                   |
| x g              | Gravedad                 |
| h                | Horas                    |
| $\mu Ci$         | Microcuries              |
| $\mu g$          | Microgramos              |
| $\mu l$          | Microlitros              |
| mg               | Miligramos               |
| ml               | Mililitros               |
| mm               | Milímetros               |
| Mmol             | Milimoles                |

|     |                                      |
|-----|--------------------------------------|
| min | Minutos                              |
| P   | Probabilidad                         |
| rpm | Revoluciones por minuto              |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos   |
| SSB | Solución salina balanceada de Hank's |

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

| Figuras  | Pagina |
|--|--------|
| 1. A) Micrografía de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .<br>B) Micrografía de quiste de <i>E. histolytica</i> . . . . .                         | 3      |
| 2. Clasificación de las fosfatidil-acil-hidrolasas, de acuerdo con la posición en la molécula del éster que hidrolizan. . . . .                    | 14     |
| 3. Obtención de las fracciones subcelulares amibianas. . . . .   | 26     |
| 4. Relación temporal del crecimiento de la cepa HM1 en medio PEHPSCV y PEHPSSV. . . . .  | 35     |
| 5. Relación temporal de la actividad hemolítica de P30 obtenida en PEHPSCV y PEHPSSV. . . . .  | 37     |
| 6. La fracción P30 obtenida en PEHPSCV y PEHPSSV presentan actividad hemolítica dependientes de la dosis. . . . .                                  | 38     |
| 7. Relación temporal de la actividad fosfolipásica de P30 obtenida de los medios PEHPSCV y PEHPSSV. . . . .  | 40     |
| 8. Relación entre la cantidad de proteína total de P30 obtenida de los medios PEHPSCV y PEHPSSV y la liberación del [ <sup>14</sup> C]AGL. . . . . | 42     |
| 9. Producción de abscesos hepáticos en hámsters con trofozoítos cultivados en medio PEHPSCV. . . . .   | 43     |
| 10. Producción de abscesos hepáticos en hámsters con trofozoítos cultivados en medio PEHPSSV. . . . .  | 44     |
| <br>   |        |
| Tabla  | Pagina |
| I. Relación de animales con absceso hepático amibiano y resultados de su análisis estadístico . . . . .  | 45     |

## RESUMEN

Héctor Gerardo Lozano Garza      Fecha de Graduación: Septiembre  
2000

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Título del Estudio:** COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA, FOSFOLIPÁSICA Y PRODUCCIÓN DE ABSCESOS HEPÁTICOS DE *Entamoeba histolytica*, CULTIVADA EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE VITAMINAS.

**Número de páginas:** 81      **Candidato para el grado de Maestría en Ciencias Veterinarias con especialidad en Salud Animal**

**Area de Estudio:** Biología Celular.

**Propósito y Método del Estudio:** Los microorganismos utilizan a los nutrientes para su crecimiento, cuando estos se cultivan fuera de su hábitat, se utilizan medios de cultivo que contengan los elementos químicos necesarios para su óptimo desarrollo. Uno de estos elementos esenciales son las vitaminas que pueden ser liposolubles e hidrosolubles.

En los trabajos de investigación en *E. histolytica* y su relación con las vitaminas 107 de Diamond, se ha encontrado que no hay diferencia estadísticamente significativa en los rendimientos de las amibas. Hasta la fecha, no existen reportes sobre la contribución de las vitaminas, en la expresión y producción de los factores putativos involucrados en la virulencia de este protozoario. Por ello, en esta tesis nos propusimos explorar el efecto de estas vitaminas con respecto a algunas actividades líticas de *E. histolytica* como son: la actividad hemolítica, fosfolipásica y la producción de abscesos hepáticos amibianos.

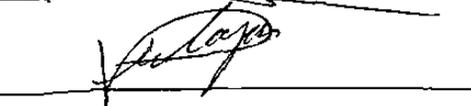
Como paso inicial, determinamos la participación de las vitaminas 107 de Diamond, en el crecimiento de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS en el medio PEHPS; donde encontramos lo esperado, una curva típica de crecimiento en presencia (PEHPSCV) y ausencia de estas vitaminas (PEHPSV). El tiempo de duplicación correspondió a (8.75 y 8.11 h), el tiempo de generación a (13.7 y 14.79 h), la velocidad de crecimiento a ( $0.049 \text{ h}^{-1}$  y  $0.043 \text{ h}^{-1}$ ) respectivamente. Obteniendo que no hay diferencia estadísticamente significativa entre ambos tratamientos.

Decidimos entonces analizar la actividad hemolítica de la fracción P30 obtenida de trofozoítos cultivados en medio PEHPSCV y PEHPSSV. Encontramos una diferencia estadísticamente significativa de alrededor de 2.5 veces más la actividad hemolítica en PEHPSCV. Una relación similar la encontramos cuando probamos la actividad fosfolipásica del tipo A<sub>2</sub> en ambos tratamientos, donde encontramos un incremento en la producción de los ácidos grasos libres entre 0-150 µg y una diferencia de 2.8 veces mas actividad en PEHPSCV.

Además nos interesó conocer sí el daño en los hígados de Hámsters Sirio Dorados (*Mesocricetus auratus*), podría incrementar con las amibas cultivadas en PEHPSCV y PEHPSSV. Las imágenes fotográficas presentadas en esta tesis, nos permitieron observar que los abscesos producidos por las amibas cultivadas en el medio PEHPSCV fueron en proporción y tamaño 3.25 veces mayores que los abscesos encontrados en el tratamiento PEHPSSV.

**Contribuciones y Conclusiones:** Las actividades líticas estudiadas en esta tesis, se comportaron en forma y proporción similares; deduciendo que las vitaminas 107 de Diamond pudieran estar implicadas en la producción de algún(os) factor de virulencia, involucrados como cofactores enzimáticos o bien seleccionando una subpoblación de amibas que sea más virulenta. El conocimiento más profundo en la participación de las vitaminas 107 de Diamond permitirá determinar la contribución específica de éstas en los mecanismos citolíticos de *E. histolytica*.

FIRMA DEL DIRECTOR EXTERNO: 

FIRMA DEL DIRECTOR INTERNO: 

## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Héctor Gerardo Lozano Garza

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Salud Animal

Tesis: COMPARACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA, FOSFOLIPASICA Y PRODUCCIÓN DE ABSCESOS HEPÁTICOS DE *Entamoeba histolytica* CULTIVADA EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE VITAMINAS

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 22 de Julio de 1955, hijo de Humberto Lozano Villarreal y Rosa Elia Garza Álvarez.

Educación: Egresado del Centro de Estudios Universitarios, grado obtenido Médico Veterinario Zootecnista en 1984.

### EXPERIENCIA PROFESIONAL:

|                |  |
|----------------|--|
| INSTITUCION:   | LABORATORIO DE NEUMOLOGIA DEL HOSPITAL DE ZONA No 21 DEL I.M.S.S.                            |
| ENTRENAMIENTO: | REALIZACION DE BACILOSCOPIAS PARA LA DETECCION DE BACILOS ACIDO-ALCOHOL RESISTENTES. (BAAR). |
| PERIODO:       | DE 1977 A 1978.  |
| INSTITUCION:   | LABORATORIO DE ANALISIS CLINICOS. HOSPITAL DE GINECO-OBSTETRICIA. No 23. I.M.S.S.            |
| ENTRENAMIENTO: | EN DEPARTAMENTOS DE HEMATOLOGIA BACTERIOLOGIA, QUIMICA SANGUINEA Y TOMA DE MUESTRAS.         |
| PERIODO:       | DE 1978 A 1979.  |
| INSTITUCION:   | LABORATORIO DE PATOLOGIA HOSPITAL DE GINECO-OBSTETRICIA No 23. I.M.S.S.                      |
| ENTRENAMIENTO: | ESTUDIOS CITOLOGICOS Y CORTES HISTOPATOLOGICOS Y SU TINCION.                                 |
| PERIODO:       | DE 1979 A 1981.  |
| INSTITUCION:   | LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR. CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DEL NORESTE. I.M.S.S.  |
| ENTRENAMIENTO: | CULTIVO DE AMIBAS.   |

PERIODO: PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO. COLECCION Y EVALUACION DE MATERIAL BIOLÓGICO Y ANIMALES EN ESTE LABORATORIO. DE 1981 A 1989.

INSTITUCIÓN: BIOTERIO. CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DEL NORESTE. I.M.S.S.

ENTRENAMIENTO: MANEJO DE BIOTERIOS, MANTENIMIENTO, REPRODUCCION Y ABASTO DE ANIMALES DE LABORATORIO. CONTROL TÉCNICO MÉDICO QUIRÚRGICO.

PERIODO: DE 1989 A LA FECHA.

INSTITUCIÓN: FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA U.A.N.L.

ENTRENAMIENTO: DIPLOMADO EN ANIMALES DE LABORATORIO

PERIODO: NOVIEMBRE DE 1994 A ABRIL DE 1995.

### PUBLICACIONES:

1. Salvador Said-Fernández, Javier Vargas-Villarreal, Jorge Castro-Garza, Benito David Mata-Cárdenas, Leticia Navarro-Marmolejo, Gerardo Lozano-Garza and Herminia Martínez-Rodríguez. PEHPS Medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *invadens*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 82: 249-253, 1988
2. S. Said-Fernández B. D. Mata-Cárdenas, J. Castro-Garza, H. Martínez-Rodríguez, L. Navarro Marmolejo, and G. Lozano-Garza. Axenic massive cultivation of *Entamoeba histolytica* trophozoites in spinner flasks and in a microfermentor. Archives of Medical Research. 23: 57-58: 1992.
3. M.T. González Garza, G. González-Qiroga, G. Lozano-Garza, R. Garza-Chapa, and S. Said-Fernández. Orally Administered Gossypol Has No Effect on Eight Hamster Erythrocytic Enzymes. 52: 377-379, 1995
4. González-Garza MT, Castro-Garza J, Anaya-Velazquez F, Mata-Cárdenas B.D, Lozano-Garza G, Carranza-Rosales MP, Vargas-Villarreal J and Said-Fernández. Anti amoebic effect of gossypol in golden hamsters with experimental hepatic amoebic abscess. Pharmaceutical Science. 2: 1-4: 1996
5. González-Garza MT, Castro-Garza J, Anaya-Velazquez F, Mata-Cárdenas B.D, Lozano-Garza G, Carranza-Rosales MP, Vargas-Villarreal J and Said-Fernández. Gossypol Anti-amebic Effect in vivo Archives of Medical Research. Vol. 28 suppl. Pp.S298-S299, 1997.
6. González-Garza M.T, Mata Cárdenas B.D, Lozano-Garza G, Carranza-Rosales P, Cruz-Vega Delia E., Said-Fernández Salvador. Estudio preliminar del efecto antiamebico in vivo de la combinación gossipol-metronidazol, sobre el desarrollo de un absceso hepático amibiano en hamsters. Rev. Invest. Med. SS. Vol. 2, pp.43-46, 1997.
7. C. Calzado-Flores, J. Verde-Star, G. Lozano-Garza, J.J. Segura-Luna. Preliminary acute toxicological study of castela texana. Proc. West. Pharmacol. Soc. 41: 77-78 (1998)

# 1. INTRODUCCION

## 1.1. IMPORTANCIA DE LA AMIBIASIS

La amibiasis es una infección parasitaria ocasionada por *Entamoeba histolytica* (Who Expert Comité. 1969, Eldson-Dew, R. 1968) con o sin síntomas clínicos. Se distribuye universalmente afectando aproximadamente al 10% de la población mundial (Walsh, J. A. 1986). Esta enfermedad ocupa el tercer lugar como causante de muerte producida por protozoarios. Se estima que anualmente ocurren 75,000 muertes por amibiasis en el mundo (Guerrant, R.L. 1986). En México es un problema importante de salud pública por su frecuencia y mortalidad (Gutierrez, G., y Muñoz, O. 1994; Brandt, H., Perez-Tamayo, R. 1991).

Siguiendo la clasificación recomendada por la Sociedad de Protozoólogos (Carliss, J.O. *et al.* 1969) y modificada posteriormente por Levine y col. en 1980 (Levine, N. D. *et al.* 1980), las amibas pueden ser clasificadas como:

## 1.2. CLASIFICACIÓN DE *Entamoeba histolytica*

|            |                            |
|------------|----------------------------|
| REINO      | - <i>Protísta</i>          |
| SUBREINO   | - <i>Protozoa</i>          |
| PHYLUM     | - <i>Sarcomastigophora</i> |
| SUBPHYLUM  | - <i>Sarcodina</i>         |
| SUPERCLASE | - <i>Rhizopoda</i>         |
| CLASE      | - <i>Lobosea</i>           |
| SUBCLASE   | - <i>Gymnamoebia</i>       |
| ORDEN      | - <i>Amoebida</i>          |
| SUBORDEN   | - <i>Acantophodina</i>     |
| FAMILIA    | - <i>Endamoebidae</i>      |
| GENERO     | - <i>Entamoeba</i>         |
| ESPECIE    | - <i>histolytica</i>       |

La clasificación de las especies de *Entamoeba*, se basa en el número de núcleos en el quiste maduro. *E. histolytica* presenta un quiste cuadrinucleado y es de importancia médica, por su patogenicidad específica para el humano.

### 1.3 CICLO DE VIDA

*Entamoeba histolytica* presenta cuatro etapas fundamentales (trofozoíto, enquistamiento, desenquistamiento y colonización), con las siguientes fases en su ciclo de vida: trofozoíto, prequiste, quiste, metaquiste y trofozoíto metaquístico (Martinez-Palomo, A. 1982)

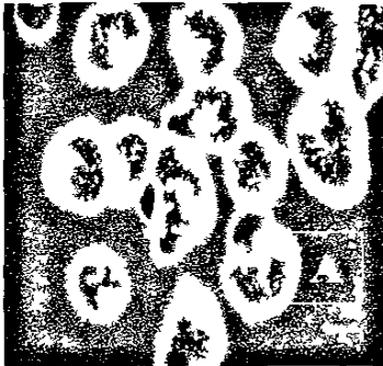


Figura 1. A) Micrografía de trofozoítos de *E. histolytica*.

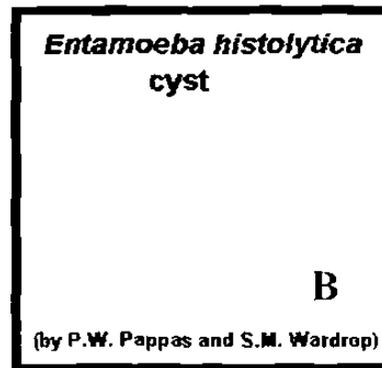


Figura 1. B) Micrografía de quiste de *E. histolytica*.

**Trofozoíto.** Fluctúan entre 10 y 60 micras ( $\mu$ ) de diámetro, pero la mayoría son de 15 a 30 ( $\mu$ ) dependiendo de las cepas y estado de desarrollo (Dobell, C. 1928). Los trofozoítos son células altamente dínámicas y pleomorficas, cuya forma y motilidad son extremadamente sensibles a cambios en el medio ambiente fisicoquímico. La célula vegetativa se reproduce por fisión binaria, lo que ya ha sido confirmado por microcinematografía (Dobell, C. 1928). Los movimientos resultan de la formación de prolongaciones pseudopódicas del ectoplasma digitiformes, largas o anchas, o redondeadas, en el interior de las

cuáles fluyen en el endoplasma. El movimiento puede ser continuo o intermitente y los trofozoítos pueden moverse a una velocidad de 50 ( $\mu$ ) por segundo (Deschiens, R. L. 1965). El protoplasma de *E. histolytica* se puede dividir en: ectoplasma (periferia de los trofozoítos) y endoplasma (donde se puede observar las vacuolas digestivas). En el centro de la masa protoplasmática, está el núcleo esférico con un diámetro de aproximadamente la quinta o sexta parte de las amibas completas.

El trofozoíto es microaerofílico, carece de mitocondrias y de aparato de Golgi, vive y se multiplican por algún tiempo en las criptas del intestino grueso, utilizando las secreciones mucosas y bacterias endémicas como alimento. (Fig. 1. A )

**Enquistamiento.** En condiciones naturales no se produce el enquistamiento, esto sucede a medida que la materia fecal se va deshidratando en la luz del colon. Los trofozoítos se condensan primeramente en una masa esférica, formando así el **prequiste**, éste último es un estadio intermedio entre los estadios de trofozoítos y el quiste (Faust, E. C. *et al.* 1974).

El prequiste siempre es más pequeño que el trofozoítos pero más grande que los quistes debido a las inclusiones alimenticias; su acción pseudopodial es lenta y no hay movimiento progresivo. Después de un tiempo el prequiste empieza a secretar una cubierta delgada (pared celular) resistente, dando lugar

al quiste inmaduro habiendo una reorganización de la estructura nuclear durante éste estadio (Faust, E. C. *et al.* 1974; Larsh, J.E.1972).

La fase **quística** es el estadio infectivo de las amibas. El quiste usualmente es redondo, inmóvil y posee una pared celular la cual es muy resistente a diferentes condiciones ambientales (Cleveland, R. L., Sanders, E. P. 1930), aunque, los quistes son resistentes a las secreciones gástricas, no pueden resistir por períodos prolongados a la deshidratación, a temperaturas superiores a 50 °C, a la luz solar o al agua clorinada (Kott, H. y Y, Kott. 1970). Los quistes presentan cuatro núcleos, producidos por dos mitosis consecutivas del mismo, cada uno de los cuales es una réplica del núcleo original (Fig. 1. B ) (Faust, E. C. *et al.* 1974).

**Desenquistamiento.** Se ha observado que los jugos gástricos debilitan la pared celular del quiste, siendo el pH alcalino y los jugos pancreáticos los que permiten que las amibas multinucleada o **metaquistes**, salga al exterior del quiste por una hendidura de la pared y de la membrana plasmática, envolviendo esta última a cada uno de los metaquistes. Inmediatamente, el citoplasma se divide, de tal modo que cada núcleo pasa a ser el centro de un pequeño trofozoíto metaquístico (Martínez-Palomo, A., 1982; Faust, E. C. *et al.* 1974).

**Colonización.** Los trofozoítos metaquísticos de *E. histolytica*, no colonizan intestino delgado, sino que son arrastrados hacia el ciego en el

intestino grueso, donde uno o más trofozoítos podrían invadir la mucosa o alojarse en las criptas glandulares del intestino. Una vez que las amibas comienzan a alimentarse y crecer, llegan a convertirse en trofozoitos normales y se completa el ciclo de desarrollo (Martínez-Palomo, A., 1982; Faust, E. C. *et al.* 1974).

Las formas de amibiasis pueden incluirse en dos grupos: intestinal y extraintestinal. En el primer grupo se incluyen los casos de portadores asintomáticos y los de disentería crónica y aguda. La amibiasis intestinal aguda y la extraintestinal se consideran como amibiasis invasora. Esta última puede localizarse prácticamente en cualquier otro órgano fuera del intestino siendo el absceso hepático sin duda la complicación extraintestinal mas frecuente de la amibiasis invasora (Faust, E. C. *et al.* 1974).

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1. VITAMINAS

La gran meta que tiene un microorganismo es crecer y dividirse; para ello necesita duplicar el material que posee. Los microorganismos utilizan elementos químicos que provienen del medio ambiente para transformarlos en los constituyentes característicos que los componen, a estos compuestos químicos se les llama nutrientes.

Cuando los microorganismos se separan de su hábitat (donde adquieren los nutrientes) y se cultivan en laboratorios se deben usar medios de cultivo que contengan los elementos químicos necesarios para su crecimiento y óptimo desarrollo.

Los nutrientes que requiere un microorganismo para su crecimiento se pueden clasificar en los siguientes grupos: 1.- Macronutrientes: carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. 2.- Micronutrientes: fósforo, potasio, azufre, magnesio. 3.- Vitaminas y hormonas. 4.- Elementos traza: zinc, cobre, manganeso, molibdeno, cobalto.

Con respecto a las vitaminas, estas se definen como sustancias orgánicas que los microorganismos deben obtener como nutrientes y se clasifican en dos grupos, liposolubles e hidrosolubles, estas últimas, la mayor parte de ellas, son cofactores indispensables para el buen funcionamiento de algunas enzimas. Por lo general se requieren las vitaminas en cantidades muy pequeñas. La mayoría de los microorganismos y animales superiores conservan su energía química, aprovechando la síntesis de estas vitaminas por otros microorganismos e ingiriendo a estos para su obtención, evitando de esta forma el costo bioenergético de biosintetizar las numerosas enzimas que se requieren para producir, mediante el metabolismo, a las vitaminas. (Horton H. R. *et al.* 1995)

Actualmente existen varios medios de cultivo utilizados en el laboratorio para el crecimiento vigoroso y sostenido de *E. histolytica* en forma axénica, entre ellos están los medios: a) TYI-S-33 (Diamond L. S. *et al.* 1978), b) BIS-33 (Diamond L. S. *et al.* 1978) y c) el PEHPS (Saíd-Fernández, S. *et al.* 1988). Para el crecimiento de *E. histolytica* en cualquiera de estos medios, es indispensable suplementarlos con suero de bovino, el cual aporta nutrientes necesarios, para que las amibas puedan desarrollarse y crecer vigorosamente. Se ha observado que los trofozoítos sin la presencia del suero bovino en los medios de cultivo se mueren después de tres días en incubación (Mata-Cárdenas B. D. 1998).

Por otro lado, además del suero en los medios de cultivo otro suplemento que puede o no agregársele a los medios de cultivo, son las vitaminas 107 de

Diamond (Diamond L. S. 1968; Davis, B. D. *et al* 1973), que consisten en: ácido p-aminobenzoico, niacinamida, hipocloruro de piridoxina, hipocloruro de piridoxal, hidrocloreuro de tiamina, pantotenato de calcio, l-inositol, cloruro de colina, riboflavina, biotina, ácido fólico, vitamina D2 (calciferol), vitamina K (menadiona bisulfito de sodio), vitamina B12, vitamina E (acetato de alfa tocoferol).y Tween 80 (cadenas alifáticas de 18-20 carbonos). Hoy en día, los trabajos de investigación que se han reportado sobre el uso en los medios de cultivo amibianos de las vitaminas 107 de Diamond, han sido dirigidos al crecimiento de *E. histolytica*, en donde se ha encontrado que no hay diferencia estadísticamente significativa en los rendimientos de las amibas cultivadas en estas condiciones. Hasta la fecha, no existen reportes sobre la contribución de las vitaminas, en la expresión y producción de los factores putativos involucrados en virulencia de este protozoario. (Mata-Cardenas B. D. y Said-Fernández S. 1990).

## **2. 2. VIRULENCIA DE *E. histolytica***

Desde hace algunos años se sabe que la virulencia microbiana, incluyendo la de los protozoarios, es un fenómeno muy complejo que depende de dos propiedades generales: **a)** invasividad, ó capacidad de los agentes patógenos para multiplicarse y causar destrucción localizada de los tejidos invadidos por los microorganismos y **b)** toxigenicidad, ó capacidad para producir

y liberar sustancias que pueden causar lesiones a distancia (Davis, B. D. *et al* 1973).

La virulencia de *E. histolytica*, determinada por su velocidad para destruir tejidos en animales de experimentación, es característica de cepa, y parece depender esencialmente de la invasividad de las amibas, cuyo mecanismo molecular aún se desconoce, donde en esta propiedad parece desempeñar un papel importante la citólisis mediada por contacto (Ravdin, J. I y Guerrant, R. L. 1982; Roa, V. G. y Padma, M. C. 1971).

La capacidad citolítica de los microorganismos incluyendo la de los protozoarios, es una propiedad que depende fundamentalmente de la actividad de factores conocidos genéricamente con el nombre de citolisinas, las cuales se definen como agentes capaces de causar la destrucción de células de mamífero o de cualquier otro origen, como consecuencia de la modificación de la composición química y funcional de la membrana plasmática (Roa, V. G. y Padma, M. C. 1971).

En los últimos años se ha concentrado la investigación en varias actividades citopáticas de trofozoítos enteros y extractos amibianos que podrían estar relacionados con la virulencia amibiana: a) fagocitosis (Who Expert Comité. 1969; Ravdin, J. I y Guerrant, R. L. 1982; Roa, V. G. y Padma, M. C. 1971). b) leucocitotoxicidad (Who Expert Comité. 1969; Ravdin, J. I y Guerrant, R. L.

1982; Roa, V. G. y Padma, M. C. 1971) y c) citólisis dependiente del contacto, en fragmentos de tejidos y en líneas celulares en cultivo (Who Expert Comité. 1969; Ravdin, J. I y Guerrant, R. L. 1982; Roa, V. G. y Padma, M. C. 1971; Ravdin, J. I. y Guerrant R. L. 1982; Vargas-Villarreal, J y Saíd-Fernández S. 1984; Saíd-Fernández S., y López-Revilla, R. 1982).

### **2.3. ACTIVIDAD HEMOLITICA DE *E. histolytica*.**

Craig en 1927 encontró que los cultivos poliaxénicos de *E. histolytica* lisaban eritrocitos humanos y de conejo, así como células de mucosa rectal aisladas de gatos jóvenes. Mas recientemente se encontró, que los extractos de trofozoítos de varias especies del género *Entamoeba* tienen actividad hemolítica sobre eritrocitos de diversas especies de mamífero, la cual es característica de cepa y especie (Saíd-Fernández S., y López-Revilla, R. 1982). Además de células en cultivo, los eritrocitos de mamífero se han utilizado ampliamente como modelo de experimentación para caracterizar citolisinas de diversos orígenes, usando como criterio de hemólisis, la liberación de hemoglobina. Además, los glóbulos rojos se utilizan para definir el mecanismo de acción de numerosas citolisinas, identificar sus receptores, o definir las modificaciones que sufren las membranas plasmáticas durante el proceso citolítico (Lehninger, A. L. 1979).

Saíd-Fernández y López-Revilla en 1982 descubrieron y caracterizaron una actividad hemolítica en extractos libre de trofozoítos de *E. histolytica* (Saíd-

Fernández S., y López-Revilla, R. 1982). Después Prasad y col. confirmaron y ampliaron estas observaciones (Prasad, A. K. *et al.* 1982). Más tarde se observó que este efecto hemolítico se localiza mayoritariamente en una fracción vesicular llamada P30 ya que es una fracción obtenida a 30,000 x g, donde se ha observado por microscopía electrónica, que esta fracción consiste en membranas selladas, posiblemente de membranas plasmáticas y de vesículas amibianas (Saíd-Fernández S., y López-Revilla, R. 1982). La actividad es máxima en presencia de calcio 1 mM a pH 8.0 y su potencia se incrementa hasta 100 veces después de 36 h de incubación a 37 °C (Saíd-Fernández S., y López-Revilla, R. 1982). Este efecto se debe a dos componentes uno termoestable y otro termolábil. El primero está constituido por ácidos grasos libres y se propuso que el segundo es una proteína con actividad fosfolipásica del tipo A. De hecho los ácidos grasos pueden ser el producto de la fosfolipasa durante la preincubación (Saíd-Fernández S. y López-Revilla, R. 1986).

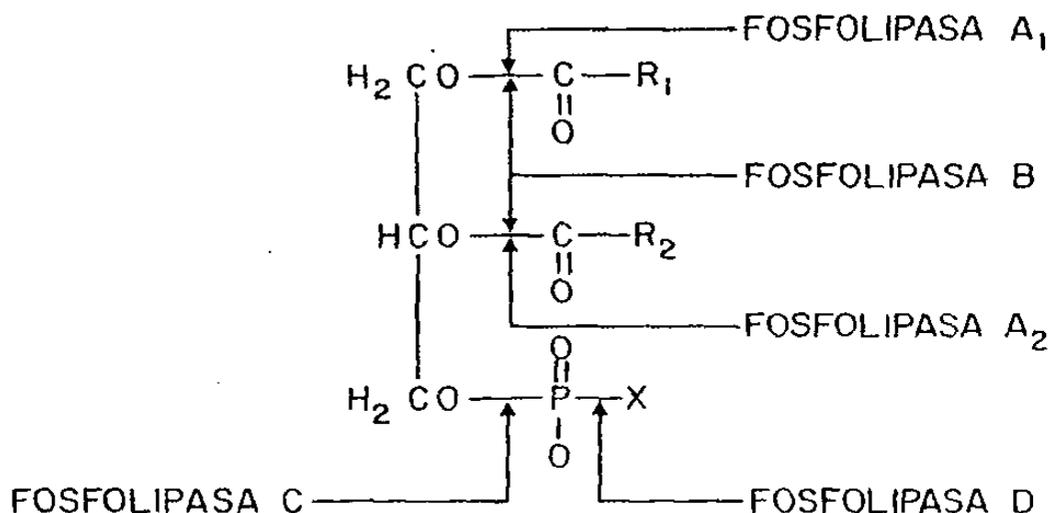
#### **2.4. FOSFOLIPASAS.**

A las fosfolipasas se les conoce desde hace 100 años (Dennis, E. A. 1983), pero fue hasta hace 20 que se inició su investigación por la importancia que tienen en ciertos procesos biológicos. Se les ha encontrado tanto dentro como fuera de las células, es por ello que se les a denominando como enzimas muy ubicuas (Van Den Bosch, H. 1980). La mayoría de estas forman parte esencial de diversos procesos fisiológicos como: I) recambio de fosfolípidos en

las biomembranas, II) digestión en los fagosomas, III) neurotoxicidad y citotoxicidad en venenos muy activos de hongos, celenterados, insectos, arácnidos y reptiles, IV) en procesos inflamatorios, V) producción de ácidos grasos libres, a partir de los cuales, las ciclooxigenasas sintetizan prostaglandinas, las cuales intervienen en muy diversos mecanismos de regulación celular (Van Den Bosch, H. 1980; Hawthorne, S. N., y Ansell, G. B. 1982; Rosenberg, P. 1976).

#### **2.4.1 CLASIFICACION**

Las fosfolipasas pertenecen al grupo de las hidrolasas y son conocidas con el nombre genérico de esterases (Dennis, E. A. 1983) ya que actúan sobre los enlaces éster de los fosfolípidos (Lehninger, A. L. 1979; Dennis, E. A. 1983). Estas enzimas se dividen en: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C y D, de acuerdo con la posición del éster que hidrolizan preferentemente (Fig. 1). (Lehninger, A. L. 1979; Dennis, E. A. 1983; Van Den Bosch, H. 1980; Hawthorne, S. N., Ansell, G. B. 1982).



**Figura 2. Clasificación de las fosfatidil-acil-hidrolasas, de acuerdo con la posición en la molécula del éster que hidrolizan.**

I) Tipo A<sub>1</sub>(EC 3.1.1.32); son aquéllas enzimas que hidrolizan la posición sn-1-fosfoglicérido, liberando el ácido graso de la posición 1 y un monoacil-2-glicerofosfátido, en forma equimolar. Estas enzimas se han encontrado en células procarióticas y eucarióticas. En general, son independientes de calcio y requieren un pH ácido ó ligeramente neutro para su funcionamiento (Dennis, E. A. 1983; Van Den Bosch, H. 1980).

II) Tipo A<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4); son enzimas lipolíticas que hidrolizan el acilo de la posición 2 de un fosfoglicérido, produciendo un ácido graso y un monoacil-1-glicero-fosfátido, en forma equimolar (Dennis, E. A. 1983). Se han aislado aproximadamente 50 de estas fosfolipasas. Principalmente de páncreas de mamíferos, veneno de serpientes, abejas y diversos microorganismos (Dennis,

E. A. 1983; Van Den Bosch, H. 1980; Hawthorne, S. N., Ansell, G. B. 1982; Rosenberg, P. 1976). Se les ha localizado extracelularmente en forma insoluble, asociadas a membranas plasmáticas o lisosomales, o solubles en lisosomas y citosol.

III) Tipo B. Se conocen a este tipo de enzimas como enzimas que rompen simultáneamente los dos ácidos grasos, quedando un gliceril-fosforilcolina. Se les ha encontrado en levaduras, bacterias y hongos. Su pH óptimo es generalmente alcalino (Dennis, E. A. 1983; Van Den Bosch, H. 1980).

IV) Tipo C (EC 3.1.4.3); catalizan la desacidificación de diacilglicerofosfolípidos en 1,2-diacilglicerol y fosforilcolina. Son producidas por ciertas bacterias o están asociadas a membrana en células vegetales, algas y levaduras (Dennis, E. A. 1983; Van Den Bosch, H. 1980; Hawthorne, S. N., Ansell, G. B. 1982).

V) Tipo D (EC 3.1.4.4); catalizan la hidrólisis del enlace éster arriba del fosfato, produciendo una molécula de colina y un 1,2-diacilgliceril-fosfátido. Este tipo de enzimas se han encontrado principalmente en plantas, levaduras y bacterias (Dennis, E. A. 1983; Van Den Bosch, H. 1980; Hawthorne, S. N., Ansell, G. B. 1982).

## 2.5. ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA DE *E. histolytica*.

Desde hace algunos años se ha estudiado intensamente a las fosfolipasas del tipo A de los más diversos orígenes, ya que su importancia radica en su capacidad para desacilar fosfolípidos y producir ácidos grasos libres y fosfolisoderivados. Ambos productos se acumulan como consecuencia de una misma reacción, pero sus efectos son muy variados, dependiendo del origen, localización y mecanismos de regulación de las hidrolasas. Las más estudiadas hasta ahora son las fosfolipasas de veneno de diversas especies de reptiles, la gran mayoría de estas fosfolipasas son del tipo A<sub>2</sub>. La mayoría de ellas se potencian fuertemente con los ácidos grasos libres y los fosfolisoderivados que se acumulan por efecto de su propia actividad (Van Den Bosch, H. 1980; Hawthorne, S. N., Ansell, G. B. 1982; Rosenberg, P. 1976; Vargas-Villarreal, J. *et al.* 1995)

Por otro lado se ha observado que las fosfolipasas A de venenos de animales, las de un gran número de microorganismos patógenos y las de linfocitos de mamífero son potentes citolisinas (Dennis, E. A. 1983; Van Den Bosch, H. 1980; Hawthorne, S. N., Ansell, G. B. 1982).

A muchos de los parásitos que se caracterizan por destruir tejidos, como las especies patógenas de *Trypanosoma* (Opperdoes, F. R., y Van Roy, J. 1982), *Acanthamoeba* (Rosenberg, P. 1976), y *Naegleria* (Hysmith, M. y

Franson, R. C. 1982) se les ha detectado actividad de fosfolipasa A, la que está fuertemente implicadas en la lisis celular y por consiguiente se le ha propuesto en el mecanismo patogénico respectivo.

Hace algunos años se propuso que las fosfolipasas del tipo A son posibles factores patogénicos de *E. histolytica*. En modelos *in vitro* de interacción, tanto con trofozoítos enteros como en extractos amibianos con células susceptibles de mamífero, la actividad citolítica amibiana parece deberse a una fosfolipasa A (Vargas-Villarreal, J. *et al.* 1995) y a otros factores como el amebaporo y proteasas (Saíd-Fernández S. *et al.* 1986).

Mas tarde Vargas-Villarreal J. y Saíd-Fernández S, encontraron que la fracción P30 proveniente de extractos de trofozoítos cultivados axénicamente de *E. histolytica* (HK9), tienen dos tipos de actividades fosfolipásicas, una A<sub>1</sub> y una A<sub>2</sub> (Vargas-Villarreal, J. *et al.* 1995).

#### **2.5.1. METODO DE ENSAYO PARA CUANTIFICAR Y DETERMINAR ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASAS.**

El método que se usa con mayor frecuencia para la cuantificación de la actividad fosfolipásica es el radioensayo, que se basa en la separación por cromatografía en placa fina de los productos de hidrólisis y del substrato no hidrolizado, marcado con radioisótopos en sitios específicos. Después se

cuantifica la radiactividad en las manchas lipídicas correspondientes de los productos de hidrólisis y esta es proporcional a la actividad fosfolipásica expresada como nanomoles de fosfolípido hidrolizado por minuto (Vargas-Villarreal, J. *et al.* 1995). El radioensayo permite también clasificar con precisión el tipo de fosfolipasa en estudio, dependiendo de la localización de la marca radiactiva en los fosfolípidos y en los productos de hidrólisis (Vargas-Villarreal, J. *et al.* 1995).

## **2.6. ABSCESOS HEPATICOS AMIBIANOS**

La amibiasis extraintestinal, se caracteriza por la invasión de las amibas, al intestino grueso, donde por vía porta comúnmente llegan al hígado y se establecen, produciendo daño localizado a los hepatocitos y de esta forma con el daño permanente se produce un absceso hepático amibiano, si las amibas no se combaten en este punto, estas podrían invadir otros órganos y producir daño en pulmón, cerebro, bazo, piel, etc. (Martinez-Palomo, A. 1989).

En personas adultas el absceso hepático es más frecuente en hombres que en mujeres, mientras que en niños prepúberes no hay diferencia estadística significativa de la enfermedad según el sexo.

Por otro lado, se ha observado que en las autopsias, realizadas a los sujetos con absceso hepático amibiano, solo el 10% no tuvieron colitis ulcerativa

amibiana. En tales casos se supone que la enfermedad intestinal había sido autolimitada o que se había curado por un tratamiento demasiado ligero para resolver a la complicación hepática (Martinez-Palomo, A. 1989).

Además, uno de los métodos para medir virulencia en *E. histolytica* ha sido evaluando el daño producido por las amibas inoculadas directamente en hígado de hámster (Kretschmer, R. R. 1994).

Macroscópicamente un absceso hepático amibiano es un área bien delimitada donde el parénquima del hígado está completamente reemplazado por material necrótico de color amarillento y de consistencia cremosa, generalmente rodeado por un anillo de tejido hepático congestivo. El material necrótico puede ser sólido blando o semilíquido; frecuentemente es espeso y algo mucoso. La parte líquida del área necrótica se encuentra en el centro del absceso, mientras que la parte sólida se adhiere a la superficie interna de la cavidad (Martinez-Palomo, A. 1989).

El tamaño del absceso hepático varía de lesiones puntiformes hasta masas de material necrótico que puede sustituir hasta el 90% del hígado normal.

## 2.7. HIPOTESIS

Es posible que la presencia de las vitaminas 107 de Diamond en el crecimiento de los trofozoítos de *E. histolytica* puedan contribuir en un aumento en la actividad hemolítica y fosfolipásica producida por la fracción vesicular P30 y la producción de abscesos hepáticos en hámsters por los trofozoítos amibianos.

## 2.8 OBJETIVO GENERAL

Comparar la actividad hemolítica, fosfolipásica y la producción de abscesos hepáticos de trofozoítos cultivados en presencia y ausencia de vitaminas 107 de Diamond.

## 2.9. OBJETIVOS ESPECIFICOS

El presente trabajo se dividió en los siguientes nueve objetivos específicos:

1) Material biológico utilizado que consistió en: a) cultivo axénico de la cepa HM1; b) obtención de los eritrocitos de rata de la cepa *Sprague Dauley*; c) mantenimiento y reproducción de los hámsters sirio dorados (*Mesocricetus auratus*). 2) El mantenimiento de las cepa de referencia de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS, en presencia (PEHPS-CV) y ausencia (PEHPS-SV) de vitaminas 107 de Diamond. 3) La obtención de la fracción vesicular P30 de las cepa

HM1:IMSS cultivadas en PEHPS-CV y PEHPS-SV. **4)** Determinación de los parámetros de crecimiento de las amibas cultivadas en PEHPS-CV y PEHPS-SV. **5)** La cuantificación y comparación de la actividad hemolítica de la fracción P30 obtenida en PEHPS-CV y PEHPS-SV, en cuanto al tiempo y la dosis necesarias para obtener  $DH_{50}$ . **6)** La determinación y comparación de la actividad fosfolipásica del tipo  $A_2$  de la fracción P30 en cuanto al tiempo y dosis en PEHPS-CV y PEHPS-SV. **7)** Reproducir y mantener a los hámster Sirio Dorados. **8)** Determinar el grado de patogenicidad de las amibas cultivadas en PEHPS-CV y PEHPS-SV estimadas por sus capacidades para producir abscesos hepáticos en hámster y **9)** Análisis estadístico de los resultados obtenidos.

### **3. MATERIAL Y METODOS**

#### **3.1.- MATERIAL BIOLÓGICO.**

##### **3.1.1. CULTIVOS AXÉNICOS DE *E. histolytica* DE LA CEPA HM1:IMSS.**

Esta cepa proviene del cepario del Dr. Salvador Saíd Fernández del Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste IMSS.

Conservamos la cepa de referencia mediante subcultivos en el medio PEHPS, además de los cultivos masivos de amibas en suspensión (Saíd-Fernández, S. y Mata-Cárdenas, B. D. 1992) en volúmenes de hasta 2 litros. Llevamos dos grupos de referencia de la cepa HM1:IMSS. El primero consistió en añadir al medio PEHPS 250 µl de vitaminas 107 de Diamond por cada 10 ml de medio y a este grupo lo llamamos PEHPS-CV; y al segundo grupo le añadimos 250 µl de SSB al cual llamamos PEHPS-SV.

### 3.1.2. OBTENCIÓN DE ERITROCITOS DE RATA DE LA CEPA

#### Sprague Dawley.

Anestesiarnos a la rata por vía intraperitoneal, con una solución de 0.063 g/ml de pentobarbital sódico de uso veterinario (Smithkline Norden, México), con jeringa desechable de 1 ml y aguja calibre No. 25 a una dosis de 3 a 5 mg/100 g de peso corporal. Con esta dosis inducimos una anestesia profunda en 10 minutos, y con una duración aproximada de una hora. Procedimos entonces a rasurar el vientre y desinfectamos el área con una solución acuosa de cloruro de benzalconio al 0.25 %. Inmediatamente después colocamos campo estéril y con tijeras realizamos laparotomía exploratoria exteriorizando y rechazando hacia la derecha las asas intestinales y de esta forma visualizar la arteria aorta descendente. Colectamos la sangre y la diluimos con un volumen igual de solución de Alsever, mediante punción aórtica con aguja calibre No.20. Inmediatamente después del sangrado obtuvimos los eritrocitos con tres lavados de la sangre por centrifugación (9 min. a 600 x g y 4 °C); los dos primeros lavados se hicieron con PBS (solución amortiguadora de fosfatos: NaCl 6.5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.8 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 g en 1000 ml de agua a pH 7.0) y el tercero con SSB (solución salina balanceada de Hanks: CaCl<sub>2</sub> 0.0175 g; Glucosa 0.1 g; NaCl 0.72 g; KCl 0.4 g; MgSO<sub>4</sub> 0.02 g; Trizma base 0.012 g en 100 ml de agua a pH 8.0 con una osmolaridad de 290 mOsm/Kg). Después de cada centrifugación eliminamos por aspiración el sobrenadante líquido y el sedimento blanco (leucocitos) depositados sobre la pastilla de eritrocitos.

Fraccionamos los paquetes celulares en alícuotas de 1 ml y los almacenamos a 4 °C hasta por una semana.

### **3.1.3. MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*.**

Como modelo experimental para producir amibiasis hepática, utilizamos hámsters sirio dorados (*Mesocricetus auratus*), machos recién destetados, con un peso de 40-60 g,(Kretschmer, R. R. 1994) los cuales fueron criados y mantenidos en el bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste.

### **3.1.4. MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE CRÍAS DE HÁMSTER A NIVEL DEL BIOTERIO.**

Utilizamos hámsters jóvenes adultos en edad reproductora de 6 a 8 semanas con un peso de entre 80 y 100 g. El sistema reproductivo que usamos para la obtención de crías fue el sistema poligámico harén en el cual se aparean, un grupo de 5 hembras con 2 machos por un período de 8 a 12 días, después de este tiempo retiramos a las hembras, y las alojamos en jaulas individuales donde de 4 a 15 días después iniciaron el parto, una hembra puede parir en promedio entre 5 y 10 crías. Las crías al nacer son poco desarrolladas y exigen temperaturas elevadas, por tal motivo las hembras construyen un nido, denominado " nido maternal ", en el cual se inicio el parto. A la semana de nacidas las crías, fueron sexadas y mantenidas en lactación por un período de 26 a 28 días, después de este período, las separamos en dos

grupos de machos y hembras, de 25 animales por jaula, formando así los grupos que más tarde utilizamos para los experimentos planteados en este proyecto de tesis (Harkness, J. E y Wagner, J. E. 1980).

### **3.2.- TROFOZOITOS ENTEROS.**

Incubamos las cepas HM1:IMSS de *E. histolytica* a 37 °C en los medios PEHPS-CV y PEHPS-SV. Antes de cada resiembra observamos los cultivos en un microscopio invertido para comprobar el buen aspecto morfológico y la movilidad de las amibas. Después sumergimos suavemente, botellas o tubos en agua-hielo por 10 min, los agitamos suavemente determinando la concentración amibiana con un hemacitómetro e inoculamos un número conocido de amibas en tubos o botellas conteniendo medio PEHPS-CV o PEHPS-SV. Cosechamos las amibas mediante enfriamiento en agua-hielo por 10 min y las centrifugamos a 600 x g por 10 min. a 4 °C y las lavamos con SSB.

### **3.3. FRACCION SUBCELULAR P30**

Resuspendimos los trofozoitos provenientes de cada medio de cultivo en presencia y ausencia de vitaminas y las lavamos con dos volúmenes de amortiguador SSB agitando suavemente con pipeta Pauster y homogeneizamos con 100 golpes de un homogeneizador tipo Elvehjem-Potter de borosilicato con émbolo de teflón (Bellco, Glass Inc. N. Y. EUA) activado con un motor eléctrico

a 1000 rpm. Después de este tratamiento centrifugamos el extracto total a 135 x g por 15 min obteniendo un sedimento, la fracción nuclear (N) y el sobrenadante correspondiente, a este ultimo lo centrifugamos a 30,000 x g por 30 min. El sedimento corresponde a la fracción P30, la cual la resuspendimos con un volumen de amortiguador de SSB y la guardamos a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Durante este proceso, manipulamos todas las muestras a  $4^{\circ}\text{C}$ . (Fig.3)

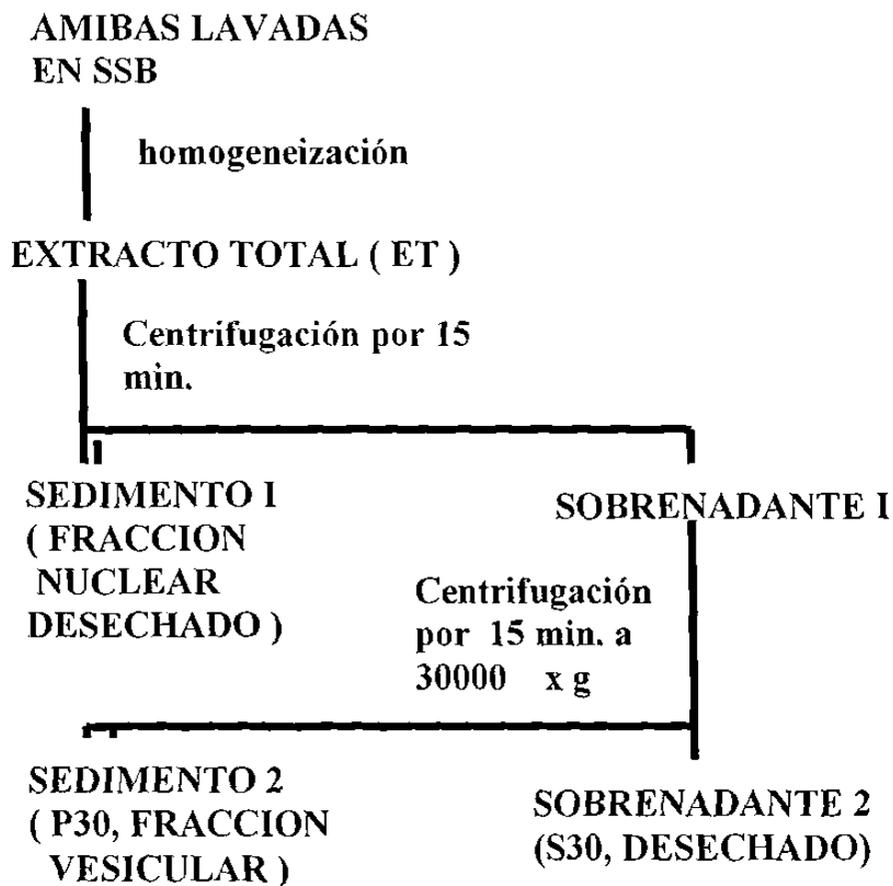


Figura 3. Obtención de las fracciones subcelulares amibianas.

### **3.4.- DETECCION DE PARAMETROS DE CRECIMIENTO DE TROFOZOITOS DE *E. histolytica* CULTIVADOS EN PEHPS-CV Y PEHPS-SV.**

Mantuvimos a los trofozoitos en los medios de cultivos PEHPS-CV y PEHPS-SV, resemebrando estos, en cada medio a 3 tubos a la vez; del mejor inoculamos 1,000 amibas por ml a cada uno de los tres nuevos tubos con medio PEHPS-CV o PEHPS-SV fresco respectivamente. Conservamos los de la penúltima resiembra hasta comprobar el crecimiento de las amibas y la ausencia de contaminación en los cultivos recién sembrados. Para determinar los parámetros de crecimiento realizamos curvas de crecimiento, donde resemebramos 28 tubos conteniendo 10 ml de medio PEHP, 1 ml de suero bovino, 1,000 amibas por ml y 250 µl de vitaminas 107 de Diamond (PEHPS-CV). Por otra parte resemebramos otros 28 tubos en las mismas condiciones arriba descritas pero con la diferencia que le agregamos 250 µl de SSB (PEHPS-SV), en lugar de las vitaminas 107 de Diamond. Los tubos los incubamos a 37 °C y cada 24 horas tomamos 4 tubos de cada grupo, los pusimos en agua-hielo por 10 min y con un hemacitómetro sacamos la concentración de amibas por ml, esto lo hicimos por 7 días. Con los datos obtenidos los procesamos por regresión lineal, para obtener los parámetros de crecimiento como: tiempo de duplicación, tiempo de generación y velocidad de crecimiento. La regresión lineal se realizó a partir de la distribución del número de amibas (variable dependiente) y con respecto al número de días (variable independiente) entre 0 a 7 días, donde obtuvimos 3 fases de la curva de

crecimiento (adaptación, logarítmica y la fase estacionaria). De la fase logarítmica en proporción lineal se aplicó el análisis estadístico de regresión lineal para determinar los parámetros de crecimiento antes mencionados.

### **3.5. CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA.**

Determinamos la actividad hemolítica mediante la liberación porcentual de hemoglobina. En tubos de polipropileno (Eppendorf de 1.5 ml) con 25  $\mu$ l de eritrocitos de rata al 2%, ajustamos los volúmenes de las mezclas de ensayo a 50  $\mu$ l con SSB (control negativo), fracción P30 obtenida en medio PEHPS-CV o PEHPS-SV y las incubamos a 37 °C en un baño de agua por tiempos variables. Al cabo de los cuales añadimos 1 ml de PBS, centrifugamos los tubos por 9 min. a 600 X g, en una centrifuga (Beckman de 12 plazas) y medimos la absorbancia de los sobrenadantes a 415 nm. La determinación de la actividad hemolítica de la fracción P30 (fracción con mayor actividad hemolítica 84%) se obtuvo, mediante la liberación porcentual de hemoglobina. La absorbancia de los lisados de eritrocitos de rata es máxima a 415 nm. Calculamos la liberación porcentual de hemoglobina de la fracción subcelular P30 (150  $\mu$ g de proteína total). Dividimos el promedio de las absorbancias contra la liberación de hemoglobina (obtenida por choque hipotónico con agua destilada –control positivo-), multiplicada por 100.

Graficamos el porcentaje de hemoglobina liberada contra la concentración de las P30 obtenidas PEHPS-CV y PEHPS-SV y obtuvimos curvas sigmoideas en cuyas regiones lineales determinamos por interpolación la dosis hemolítica media (DH<sub>50</sub>).

### 3.6.- METODO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA.

Determinamos la actividad fosfolipásica del tipo A<sub>2</sub>, basándonos en el método descrito por Vargas-Villarreal J. y col. (Vargas-Villarreal, J. *et al.* 1995), que consistió en: determinar los productos de hidrólisis (ácidos grasos liberados (AGL) y lisofosfatidilcolina (LFC)) del 2-palmitoil-[2-palmitoil <sup>14</sup>C]fosfatidilcolina ([<sup>14</sup>C]FC). Este sustrato está marcado en el carbono 1 del ácido palmítico esterificado en la posición 2 del glicerol, considerando que si la radioactividad se localizaba en las manchas cromatográficas correspondientes a [<sup>14</sup>C]LFC, pero no en las de [<sup>14</sup>C]AGL, la enzima sería del tipo A<sub>1</sub>. En el caso contrario estas corresponderían a una fosfolipasa del tipo A<sub>2</sub>. Los lípidos marcados fueron diluidos con fosfatidilcolina (FC) de yema de huevo a una concentración específica de 1800 µCi/mole y solubilizadas en presencia de 0.4 % de Tritón X 100. Estas mezclas fueron diluidas 1:1 con la fracción P30. El ensayo final (0.02 ml) contiene: 100 mM de Tris-HCL, pH 8.0, 0.138 mM de FC, 0.2% de Tritón X 100, 1 mM de calcio y la muestra. Después de tiempos variables de incubación o concentraciones diferentes de proteínas, la reacción fue parada con 25 µl de una mezcla de FC (0.75 mg/ml), AGL (1 mg/ml), LFC (1 mg/ml) en TCA-butanol

(5 %), agitamos los tubos en un vórtex. Determinamos la radioactividad presente en las manchas correspondientes a FC, LFC y AGL, separadas mediante cromatografía en placa fina (Vargas-Villarreal, J. *et al.* 1995). Aplicamos 25  $\mu$ l en placas cromatográficas de sílica gel; separamos los lípidos utilizando un disolvente para lípidos no polares como son el cloroformo:metanol:ácido acético:agua (170:40:16:8). Después colocamos las placas en una cámara saturada con vapores de yodo, con lo cual las manchas lipídicas se revelaron como puntos amarillos o cafés sobre el fondo blanco (Skipsky, J. P. y Barclay, M. 1969). Finalmente mezclamos cada mancha lipídica con 5 ml de mezcla para centelleo líquido (2-5 difeniloxazole PPO, 6% en tolueno) en viales de borosilicato de 20 ml de capacidad. Hicimos la cuantificación en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Beckman Instrument, modelo Tri-Carb 1600 TR Packard A camberra Company. (Vargas-Villarreal, J. *et al.* 1995)

### **3.7. CUANTIFICACION DE PROTEINAS.**

Determinamos la concentración de proteínas en la fracción P30 amibianas (muestras particuladas) mediante el método de Lowry y *col.* (Lowry, O. H. *et al.* 1951).

### 3.8. INDUCCION DE ABSCESOS HEPATICOS PRODUCIDOS POR TROFOZOITOS DE *E. histolytica* CULTIVADOS EN PEHPS-CV Y PEHPS-SV.

Utilizamos hámsters Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*). Inoculamos  $10^6$  trofozoítos crecidos en medio PEHPS-CV o PEHPS-SV a cada hámster, utilizando 25 machos hámster por cada grupo. Anestesiarnos a los animales por vía intraperitoneal, con una solución de 0.063 g/ml de pentobarbital sódico de uso veterinario (Smithkline Norden, México), con jeringa desechable de 1 ml y aguja calibre No. 25 en dosis de 6.3 mg/100g de peso corporal. Con esta dosis inducimos una anestesia profunda en 10 minutos, y con una duración aproximada de una hora. Procedimos entonces a rasurar el vientre del hámster y desinfectamos el área operatoria con una solución acuosa de cloruro de benzalconio al 0.25 %. Inmediatamente después colocamos campo estéril y con tijeras realizamos una pequeña incisión en abdomen de 1.5 cm en la línea media, por abajo del apéndice xifoides del esternón, exponiendo el hígado. Inoculamos a cada Hámster  $10^6$  amibas, suspendidas en 0.1 ml de medio PEHP basal, directamente en el lóbulo ventral del hígado, con una aguja calibre No. 25. Después de la inoculación hicimos hemostasia en el punto de la inoculación con gelfoam esponja estéril hemostática (Upjohn), y suturamos la incisión, mediante súrgete continuo con candado, abarcando los planos peritoneal muscular y cutáneo, con seda estéril calibre 000 (González-Garza, M.T. *et al.* 1996).

La evaluación de las lesiones hepáticas la realizamos 7 días después de la inoculación, mediante una laparotomía exploratoria, practicada a cada animal de cada grupo. Para demostrar la presencia de los trofozoítos vivos en los abscesos hepáticos; tomamos piezas del tejido afectado de 0.5 cm y las pusimos directamente en el medio de cultivo PEHPS. Después de 72 h. observamos los tubos bajo el microscopio invertido para confirmar la presencia de los trofozoítos vivos.

### **3.9. ANALISIS ESTADISTICO EMPLEADO EN ESTA TESIS.**

Analizamos estadísticamente, los resultados obtenidos en las secciones anteriores, donde utilizamos prueba exacta paramétrica como: Regresión lineal, ANOCOVA (Análisis de covarianza para pendientes e intersecciones) y T de Student (para comparar medias). De las pruebas no paramétricas usamos la Prueba exacta de Fisher's para comparar el daños producido por ambos tratamientos (PEHPS-CV y PEHPS-SV) en la inducción de los abscesos hepáticos en los hámster Sirios Dorados. (Dawson B y Trapp R. G. (1993).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA HM1:IMSS CULTIVADA EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE VITAMINAS 107 DE DIAMOND.

Desde hace muchos años se han utilizado las vitaminas 107 de Diamond como un suplemento nutricional en los cultivos de *E. histolytica*. Todos los trabajos anteriores se han basado en discernir si estos componentes son esenciales para el crecimiento de las amibas en presencia de las vitaminas. Hasta la fecha no se han encontrado datos que sustenten que las amibas requieran estos factores para su crecimiento, pero esta hipótesis no se ha aplicado a factores de virulencia de las amibas, como se basó esta tesis.

Por lo anterior, decidimos explorar con mayor profundidad el efecto de las vitaminas 107 de Diamond y su participación en algunos parámetros que son considerados como factores de virulencia.

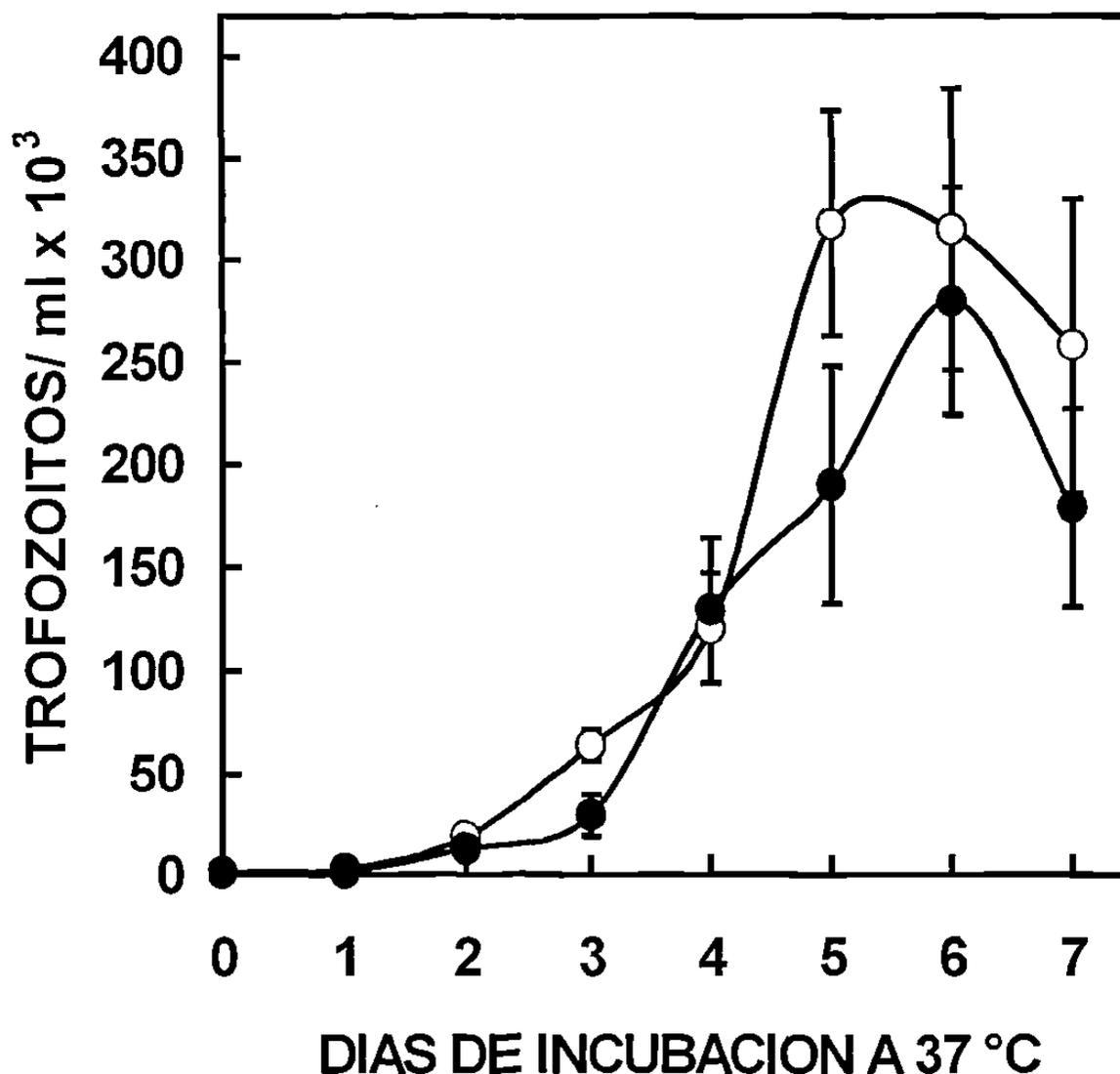
Como paso inicial, determinamos algunos factores de crecimiento de la cepa HM1:IMSS, cultivadas en el medio PEPHS, en presencia (PEHPS-CV) y ausencia (PEHPS-SV) de vitaminas 107 de Diamond. La (Fig.4) corresponde a

una curva típica de crecimiento de la cepa HM1:IMSS en medio PEHPS-CV y en medio PEHPS-SV.

Las funciones que encontramos en la fase exponencial de crecimiento en el medio PEHPS-CV correspondió a la siguiente ecuación: número de amibas/ml =  $0.04974 (120) + 7.00836$  correlación con la recta  $r^2 = 0.987$

En el medio PEHPS-SV correspondió a la siguiente ecuación: número de amibas/ml =  $0.04302 (120) + 6.9592$  correlación con la recta  $r^2 = 0.983$

A partir de cada ecuación determinamos un tiempo de duplicación de 8.75 h, un tiempo de generación de 13.7 h y su velocidad de crecimiento fue de  $0.049 \text{ h}^{-1}$  en las amibas en el medio PEHPS-CV. En las amibas cultivadas en el medio PEHPS-SV encontramos un tiempo de duplicación de 8.11 h, un tiempo de generación de 14.79 h y una velocidad de crecimiento de  $0.043 \text{ h}^{-1}$ . Con estos resultados observamos lo ya reportado por otros autores (Mata-Cárdenas B. D. y Said-Fernández S. 1990) que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la presencia y ausencia de vitaminas 107 de Diamond en el crecimiento de las amibas. Estos parámetros de crecimiento nos sirvieron además para definir tanto el inóculo como los días de cultivo necesarios para obtener cultivos creciendo en la fase exponencial y en buenas condiciones fisiológicas.



**Figura 4. Relación temporal del crecimiento de la cepa HM1 en medio PEHPS-CV y PEHPS-SV.** Inoculamos por triplicado 1,000 amibas por mililitro en tubos con 10 ml de medio PEHPS, 1 ml de suero bovino y 250  $\mu$ l de vitaminas 107 de Diamond PEHPS-CV (O) o 250  $\mu$ l de SSB PEHPS-SV (●). Después de diferentes tiempos de incubación a 37 °C determinamos la densidad de los cultivos con un hemacitómetro. Cada punto corresponde a cuatro determinaciones en dos experimentos independientes.

#### 4.2. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA DE LA FRACCION P30 OBTENIDA DE AMIBAS CULTIVADAS EN MEDIO PEHPS-CV Y PEHPS-SV.

La actividad hemolítica de las fracciones de P30 obtenida en los medios PEHPS-CV y PEHPS-SV fueron dependientes tanto del tiempo de incubación como la dosis. Estas fracciones con respecto al tiempo, encontramos que no existe un período lag en ambos tratamientos. En la P30 obtenida en PEHPS-CV encontramos que el porcentaje de hemoglobina liberada se incrementó linealmente en función al tiempo de incubación alcanzando un máximo a los 60 min. A los 23.8 min. se logra el 50% de liberación de hemoglobina (Fig. 5). Con la P30 obtenida en el medio PEHPS-SV, encontramos una curva sigmoidea donde observamos que el 50% de hemoglobina liberada fue a los 63 min. de incubación. La P30 de PEHPS-CV, fue 2.65 veces mas activa que la P30 obtenida en PEHPS-SV. Para todas las determinaciones usamos 150 µg de P30. En las curvas dosis-respuesta encontramos que la liberación de hemoglobina se incrementa en forma proporcional con concentraciones crecientes tanto con P30 obtenida en PEHPS-CV como en PEHPS-SV (Fig. 6). La  $DH_{50}$  correspondió a 53.5 y 130 µg respectivamente. La P30 de PEHPS-CV fue 2.43 veces mas activa que la obtenida en PEHPS-SV.

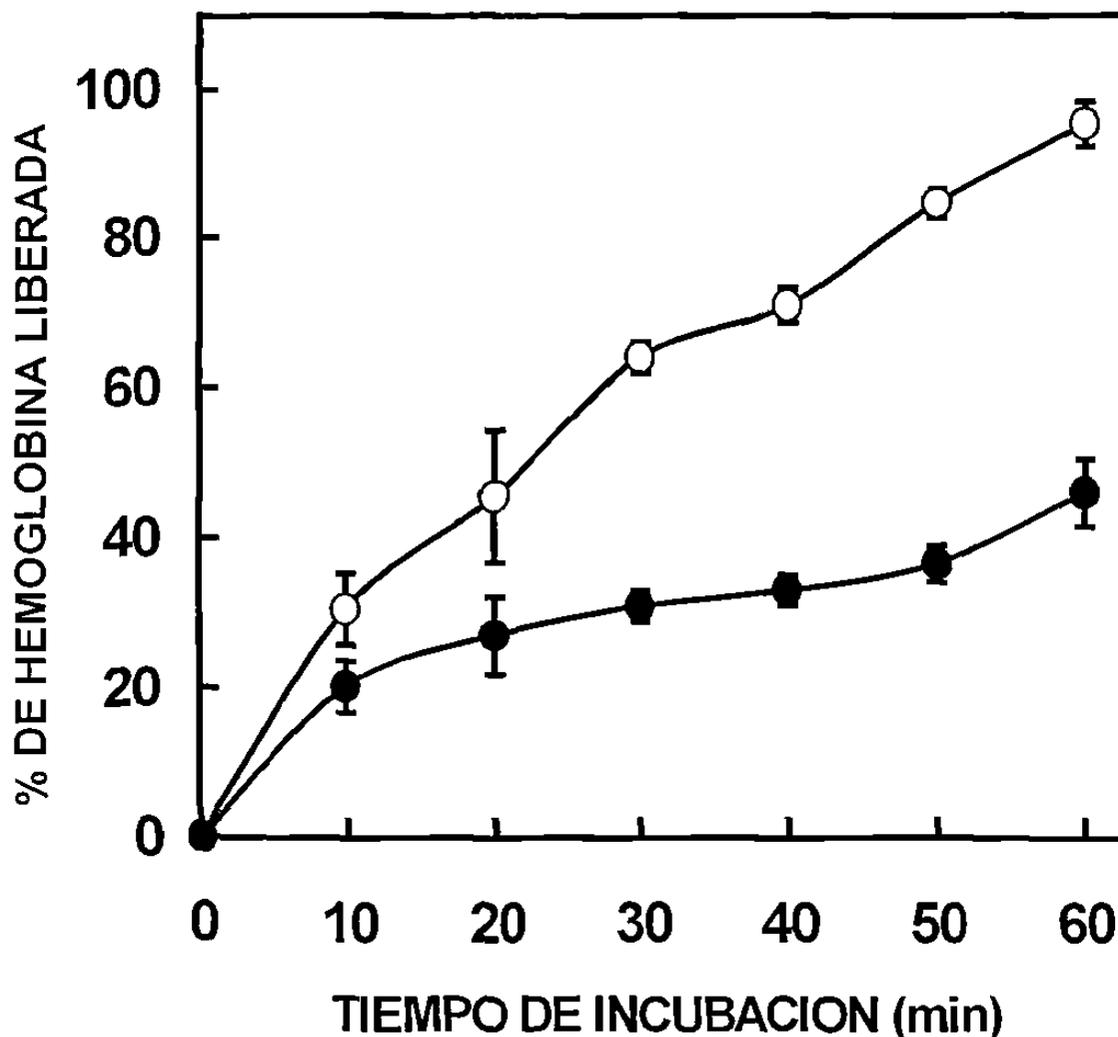


Figura 5. Relación temporal de la actividad hemolítica de P30 obtenida en PEHPS-CV y PEHPS-SV. A tiempos variables de incubación determinamos el porcentaje de hemoglobina en mezclas de ensayo con 25  $\mu$ l. de eritrocitos de rata al 2 % y 150  $\mu$ g. de proteínas de las fracciones P30 obtenida en PEHPS-CV (O) o PEHPS-SV (●). Todas las determinaciones se hicieron en las mismas condiciones y se incubaron durante el tiempo de hasta 60 min. indicado en la gráfica. Después de cada tiempo añadimos a cada mezcla 1 ml de PBS, centrifugamos los tubos a 600 x g por 9 min. a 4 °C. y medimos la absorbancia de los sobrenadantes para determinar el porcentaje de hemoglobina liberada con respecto a la de un número equivalente de eritrocitos lisados por choque hipotónico. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar de 8 determinaciones en dos experimentos independientes.

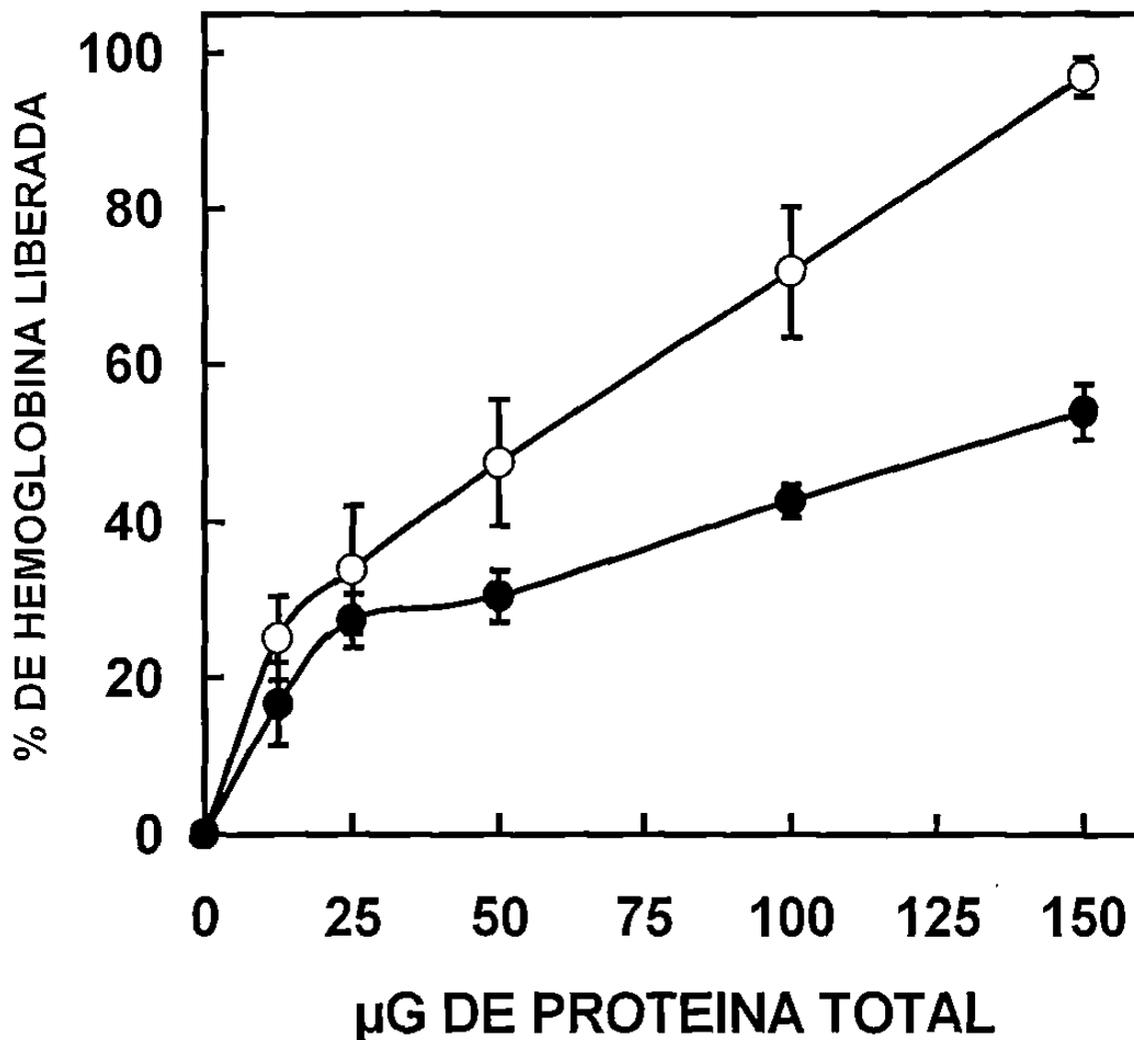


Figura 6.- La fracción P30 obtenida en PEHPS-CV y PEHPS-SV presentan actividad hemolítica dependientes de la dosis. Después de 60 min. de incubación a 37 °C. determinamos el porcentaje de hemólisis en mezclas de ensayo con 2% de eritrocitos de rata y cantidades variables de P30 obtenidas en PEHPS-CV (O) y PEHPS-SV (●) suspendidas en 25 µl. de SSB. Cada símbolo corresponde al promedio y desviación estándar de ocho determinaciones en dos experimentos independientes.

#### **4.3. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA DEL TIPO A<sub>2</sub> DE LA FRACCION P30 OBTENIDA DE AMIBAS CULTIVADAS EN MEDIO PEHPS-CV Y PEHPS-SV.**

Después de los resultados obtenidos en la hemólisis, nuestro siguiente paso fue determinar y cuantificar la presencia de actividad de fosfolipasa del tipo A<sub>2</sub> en las P30 obtenidas en PEHPS-CV y PEHPS-SV: Esta actividad es considerada como otro parámetro para medir la virulencia amibiana. Por ello nos propusimos cuantificar la actividad de fosfolipasa del tipo A<sub>2</sub> en las P30. Al incubar a 37 °C. por tiempos variables con 150 µg. de proteína total de P30 de PEHPS-CV (○) y PEHPS-SV (●), encontramos que la liberación de [<sup>14</sup>C]AGL (correspondiente a la actividad fosfolipásica de tipo A<sub>2</sub>) en ambas P30's se incrementó linealmente en función del tiempo de incubación (Fig. 7). También observamos que la radioactividad obtenida en las manchas cromatográficas de la P30 de los trofozoítos cultivados en el medio PEHPS-CV fue 2.75 veces mayor que la P30 obtenida en PEHPS-SV.

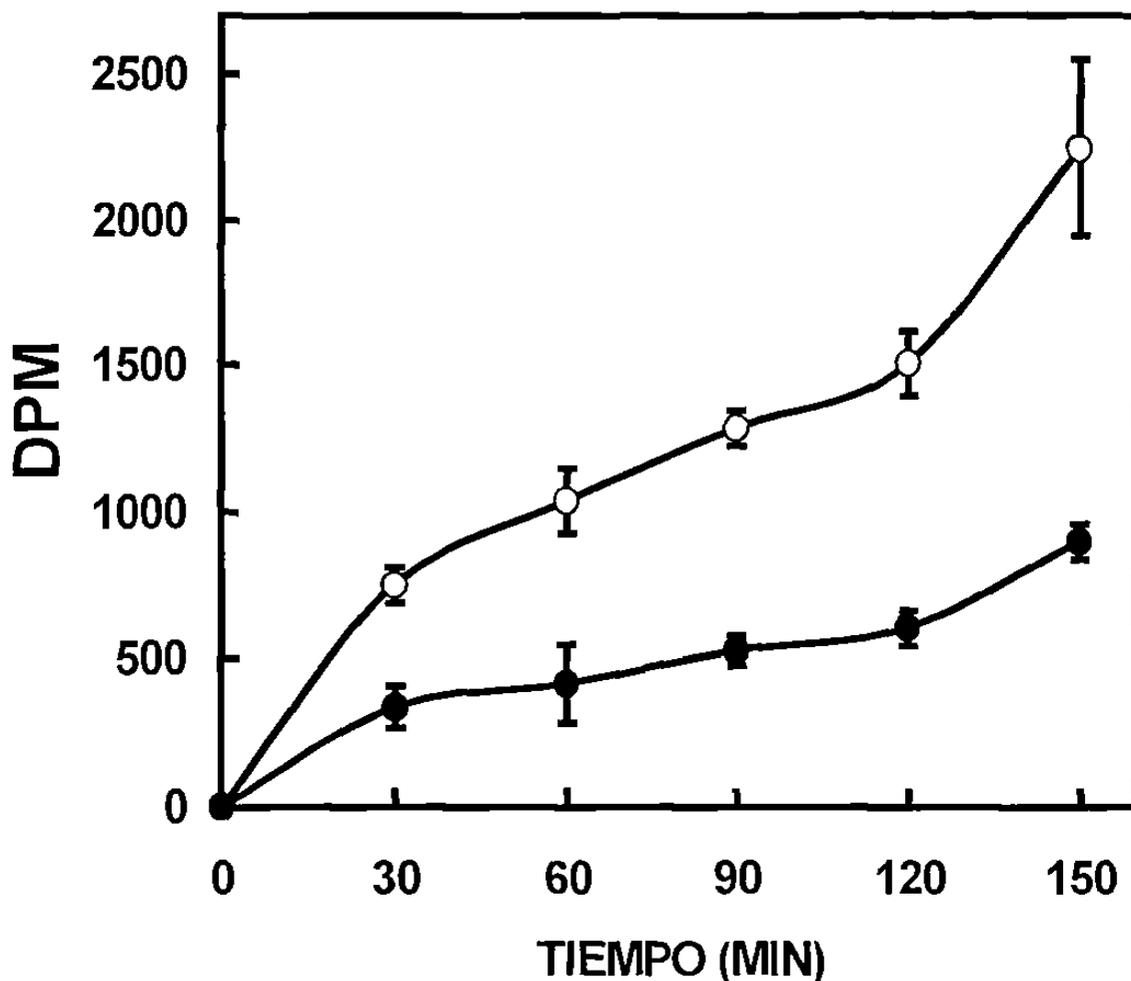
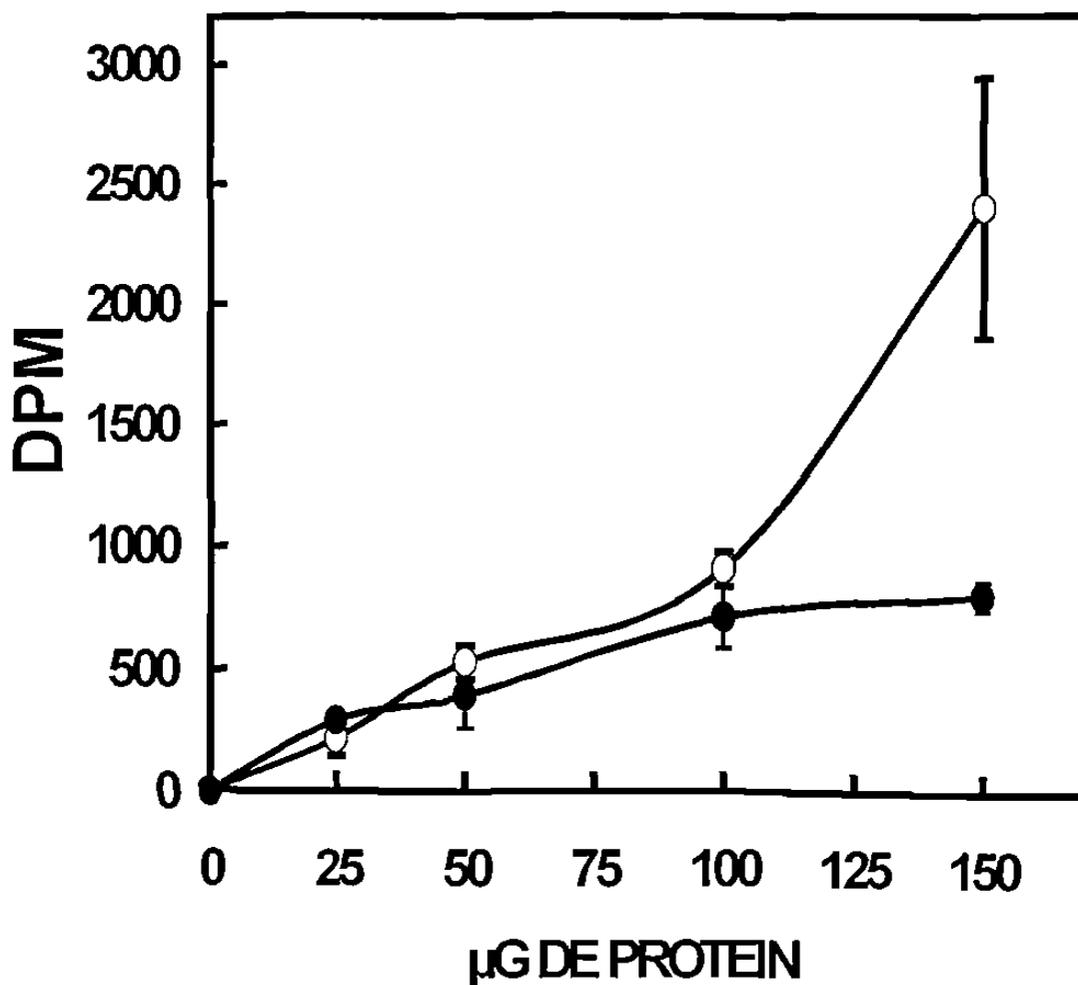


Figura 7.- Relación temporal de la actividad fosfolipásica de P30 obtenida de los medios PEHPS-CV y PEHPS-SV. A tiempos variables de incubación a 37 °C. determinamos la actividad fosfolipásica de P30 obtenida de trofozoítos en los medios PEHPS-CV (O) y PEHPS-SV (●). Cuando en las mezclas de ensayo usamos como sustrato 4  $\mu$ Ci de [ $^{14}$ C]FC(2) y 150  $\mu$ g. de proteína total de P30, suspendidas en SSB. Después de la incubación separamos los productos de hidrólisis mediante cromatografía en placa fina y las cuantificamos en un contador de centelleo líquido. Los símbolos corresponden a [ $^{14}$ C]AGL. Los puntos corresponden al promedio y desviación estándar de 8 determinaciones en 2 experimentos independientes.

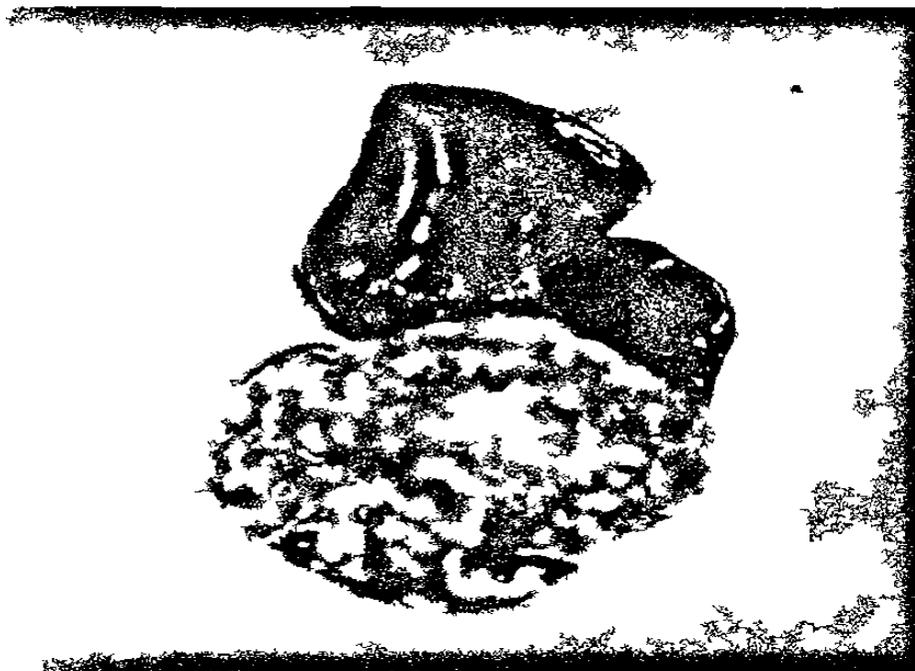
Una vez que conocimos la dependencia del tiempo en la actividad fosfolipásica de la P30 obtenida en ambos medios PEHPS-CV y PEHPS-SV; nos propusimos cuantificar estas actividades de las P30 con respecto a la dosis. Donde encontramos que la P30 se incrementaron linealmente con respecto a diferentes concentraciones de proteína entre 0 y 100  $\mu\text{g}$ . de proteína total, sin ninguna diferencia estadísticamente significativas entre ambas P30, pero con 150  $\mu\text{g}$ . de proteínas observamos que la P30 proveniente de PEHPS-CV fue 2.8 veces mayor su actividad que la P30 obtenida del medio PEHPS-SV (Fig. 8).



**Figura 8.-** Relación entre la cantidad de proteína total de P30 obtenida de los medios PEHPS-CV y PEHSSV y la liberación del [ $^{14}\text{C}$ ]AGL. Determinamos la actividad de fosfolipasa usando una mezcla de ensayo con 4  $\mu\text{Ci}$  de [ $^{14}\text{C}$ ] FC(2) y concentraciones variables de proteínas de P30 obtenidas de los medios PEHPS-CV (O) y PEHPS-SV ( $\bullet$ ). Después de 150 min. de incubación a 37 °C. determinamos la radioactividad correspondiente a la mancha lipídica de [ $^{14}\text{C}$ ]AGL después de separar los productos de hidrólisis mediante cromatografía en placa fina. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar de 8 determinaciones en 2 experimentos independientes.

#### 4.4. CAPACIDAD DE LAS AMIBAS CULTIVADAS EN PEHPS-CV Y PEHPS-SV PARA PRODUCIR ABSCESOS HEPATICOS EN HAMSTERS.

El aspecto de los abscesos hepáticos de los hámsters, inducidos por los trofozoítos de *E. histolytica* cultivados en los medios PEHPS-CV y PEHPS-SV fueron de apariencia granulosa, y ocuparon la mayor parte del lóbulo ventral, sitio donde se inocularon los trofozoítos de ambos medios de cultivo. El tamaño de los abscesos en promedio de los trofozoítos provenientes del medio PEHPS-CV fue de 2.8 cm ancho por 2 cm de largo. Además observamos que la lesión invadió también en algunos casos el lóbulo dorso-caudal izquierdo del hígado afectado (Fig. 9)



**Figura 9.- Producción de abscesos hepáticos en hámsters con trofozoítos cultivados en medio PEHPS-CV.** Cosechamos los trofozoítos en fase exponencial de crecimiento Ajustamos la concentración a  $10^6$  trofozoítos en 0.1 ml de medio basal PEHP Inoculamos esta suspensión en el lóbulo ventral del hígado de cada hámster Analizamos los resultados después de 7 días Los datos corresponden a grupos de 25 animales por grupo

En contraste el tamaño promedio de los abscesos producidos por los trofozoítos obtenidos en el medio PEHPS-SV fueron de 0.85 cm de ancho y 0.60 cm de largo. (Fig 10)



**Figura 10.- Producción de abscesos hepáticos en hámsters con trofozoítos cultivados en medio PEHPS-SV.** Cosechamos los trofozoítos en fase exponencial de crecimiento. Ajustamos la concentración a  $10^6$  trofozoítos en 0.1 ml de medio basal PEHP. Inoculamos esta suspensión en el lóbulo ventral del hígado de cada hámster. Analizamos los resultados después de 7 días. Los datos corresponden a grupos de 25 animales por cada grupo.

Los trofozoítos cultivados en medio PEHPS-CV y PEHPS-SV fueron capaces de producir abscesos hepáticos en hámsters en un 88 % y 60 % respectivamente (Tabla I). El análisis estadístico demostró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) cuando se compararon los dos tratamientos. La forma, aspecto y tamaño de los abscesos inducidos con trofozoítos cultivados en PEHPS-SV produjeron abscesos localizados cerca de la zona del inoculo y su

tamaño fue notablemente menor (3.27 veces) que los abscesos producidos por las amibas cultivadas en el medio PEHPS-CV (Fig. 9 y 10).

**TABLA I. Relación de animales que presentaron abscesos hepáticos amibianos**

| MEDIOS   | No. POSITIVOS/No. TOTAL | PORCENTAJE |
|----------|-------------------------|------------|
| PEHPS-CV | 22 / 25                 | 88 %       |
| PEHPS-SV | 15 / 25                 | 60 %       |

Estos resultados fueron evaluados por análisis estadístico no paramétrico por medio de la prueba exacta de Fischer's donde encontramos una diferencia significativa de  $P < 0.05$

## 5. DISCUSION

La virulencia de los microorganismos, incluyendo la de los protozoarios es un fenómeno muy complejo que depende de dos propiedades generales: invasividad y la toxigenicidad (Davis, B. D. *et al.* 1973). La virulencia de *E. histolytica* (cuyos mecanismos patogénicos se desconocen en gran parte), parece depender fundamentalmente de su invasividad ya que sus efectos destructivos se llevan acabo por su gran capacidad para proliferar y destruir los tejidos del huésped (Davis, B .D. *et al.* 1973; Ravdin, J. I y Guerrant, R. L. 1982). En los últimos años se han propuesto las siguientes cinco etapas como constituyentes probables en una parte importante de los mecanismos patogénicos de las amibas, y que pueden analizarse cuantitativamente *in vitro*, estas son: quimiotaxis (Roa, V. G. y Padma, M. C. 1971; Ravdin, J. I. y Guerrant R. L. 1982), adhesión a las células blanco por lectinas específicas (Roa, V. G. y Padma, M. C. 1971; Ravdin, J. I. y Guerrant R. L. 1982), citólisis por contacto (Ravdin, J. I y Guerrant, R. L. 1982; Vargas-Villarreal, J y Saíd-Fernández S. 1984; Saíd-Fernández S., y López-Revilla, R. 1982; Saíd-Fernández S, *at el.* 1986), fagocitosis (Roa, V. G. y Padma, M. C. 1971; Ravdin, J. I y Guerrant, R. L. 1982) y degradación intracelular (Roa, V. G. y Padma, M. C. 1971; Ravdin, J. I y Guerrant, R. L. 1982).

En nuestro grupo estamos interesados en estudiar los posibles factores involucrados en la citólisis por contacto de estos parásitos, sobre las células blanco. Desde hace algunos años se ha propuesto que la presencia de actividades biológicas asociadas a membrana o liberadas al medio de cultivo, podrían estar involucradas en los mecanismos líticos usados por este parásito, tales son: lectinas, colagenasa, proteínas formadoras de poros, tiol-proteasas, hemolisinas y citolisinas (Mata-Cárdenas B. D.1998; Ravdin, J. I y Guerrant, R. L. 1982; Roa, V. G. y Padma, M. C. 1971; Ravdin, J. I. y Guerrant R. L. 1982; Vargas-Villarreal, J y Saíd-Fernández S. 1984; Saíd-Fernández S., y López-Revilla, R. 1982; Saíd-Fernández S. y López-Revilla, R. 1986; Saíd-Fernández S, *et al.* 1986). En estos últimos dos mecanismos líticos se han propuesto que una o varias fosfolipasas del tipo  $A_2$  están relacionadas con estas actividades patogénicas de *E. histolytica* y que esta(s) podría(n) ser un posible factor de virulencia de este parásito (Vargas-Villarreal, J. *et al.* 1995; Saíd-Fernández S, *et al.* 1986).

Para el cultivo axénico *in vitro* de los trofozoítos de *E. histolytica* se utiliza preferentemente el medio TYI-S-33 (Diamond L. S. *et al.* 1978). En nuestro laboratorio hace mas de 10 años desarrollamos un nuevo medio de cultivo para el crecimiento de este parásito, el cual lo hemos llamado PEHPS y está compuesto principalmente de extracto de hígado de res y páncreas de res y puerco (Saíd-Fernández, S., *et al.* 1988). En ambos medios se requiere la presencia de un 9% de suero bovino o equino para que las amibas puedan

crecer vigorosamente, sin este componente las amibas se mueren a los tres días de cultivo.

En 1980 Saíd-Fernández y col. demostraron actividad hemolítica en homogenados de amibas, la mayor actividad se localizó en una fracción subcelular llamada "P30". Esta fracción (P30) es vesicular, es decir esta compuesta por vesículas selladas – analizada por microscopia electrónica de membranas celulares, así como de vesículas digestivas y lisosomales propias de los trofozoítos. Anteriormente, habíamos ya encontrado que el grueso de la actividad hemolítica, citolítica y fosfolipásica se encontraba en dicha fracción (Saíd-Fernández S., y López-Revilla, R. 1982), la cual es cuatro veces mayor que en los extractos totales amibianos (Saíd-Fernández S., y López-Revilla, R. 1986). Estas actividades son máximas en esta fracción P30 en presencia de Calcio 1 mM y a pH 8.0. Por estas razones, decidimos emplear la fracción P30 para cuantificar las actividades hemolítica y fosfolipásica en presencia y ausencia de vitaminas 107 de Diamond y determinar si estas actividades son modificadas por la presencia de estos nutrientes.

Obtuvimos la fracción P30 de los extractos totales de los trofozoítos crecidos en presencia y ausencia de vitaminas 107 de Diamond, mediante homogeneización mecánica para preservar, en lo posible, la compartimentalización subcelular (Fig 3); otros investigadores rutinariamente homogeneizan los trofozoítos mediante sonicación o ciclos repetidos de

congelación-descongelación, con lo que posiblemente se desnaturalizan algunas enzimas. Ello explicaría la falta de éxito en múltiples intentos para detectar algunas actividades en los extractos amibianos (Ravdin, J. I. y Guerrant R. L. 1982). Evitamos el uso de suero, de medios indefinidos o de cualquier componente en las mezclas de ensayo para determinar actividad hemolítica y fosfolipásica que pudieran interferir en estas actividades líticas producidas por la fracción P30.

Elegimos a la cepa HM1: IMSS de *E. histolytica* para desarrollar este trabajo por ser una de las cepas que produce mayor daño a las células (Kretschmer, R. R. 1994) y porque ella ha sido una cepa de referencia, además porque esta cepa es la más virulenta que se tiene en los laboratorios. Seleccionamos como células blanco a los eritrocitos de rata de la cepa *Sprague Dawley* por ser células susceptibles al efecto lítico de las fracciones amibianas y porque su composición y estructura de sus membranas son bien conocidas (Saíd-Fernández S., y López-Revilla, R. 1982) además estas células son muy abundantes y fáciles de obtener y manipular

Por otro lado, las vitaminas 107 de Diamond (Diamond L. S. *et al.* 1978), son un suplemento que puede o no agregarse a los medios de cultivo tradicionales. Los trabajos de investigación que se han reportado sobre el uso en los medios de cultivos amibianos en presencia de las vitaminas 107 de Diamond, han sido dirigidos sobre el crecimiento de *E. histolytica*, en donde se

han encontrado que no hay diferencia estadísticamente significativa en los rendimientos de las amibas cultivadas en estas condiciones. Hasta la fecha, no existen reportes sobre la contribución de las vitaminas, en la expresión y producción de los factores putativos involucrados en virulencia de este protozooario o bien en la selección de una subpoblación de amibas que podrían resultar más virulentas. (Gutiérrez, G y Muñoz, O. 1994).

De acuerdo con lo anterior, decidimos explorar el crecimiento de *E. histolytica* en presencia (PEHPS-CV) y ausencia (PEHPS-SV) de las vitaminas 107 de Diamond en el medio PEHPS, donde hasta la fecha no se había probado si las vitaminas podían proporcionar una diferencia en la densidad de las amibas. Cuando utilizamos esta estrategia encontramos lo que sucede en otros medios de cultivos; que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las dos pendientes, alcanzando una densidad de aproximadamente 250,000 amibas a los 6 días de incubación a 37°C en ambos tratamientos (Fig 4). Con estos resultados pudimos confirmar lo esperado, que la presencia de vitaminas 107 de Diamond no se refleja en la densidad de las amibas cultivadas *in vitro*; lo cual concuerda con lo que ya ha sido reportado por otros investigadores en otros medios de cultivo (Martínez-Palomo, A. 1982; Mata-Cárdenas B. D. 1998; Mata-Cardenas B. D. y Said-Fernández S. 1990) ya que los tiempos de duplicación y de generación correspondieron para los trofozoítos cultivados en PEHPS-CV y PEHPS-SV a 8.75 y 8.11 h. y 13.7 y

14.79 h respectivamente, no resultando una diferencia significativa entre ambos tratamientos.

En vista de los resultados anteriores decidimos analizar la participación de la actividad hemolítica de la fracción P30 obtenida de trofozoítos crecidos en PEHPS-CV y PEHPS-SV. Con respecto al tiempo de incubación encontramos que las actividades en ambos tratamientos no presentaron un período Lag, es decir ambas actividades comienzan a liberar hemoglobina por el daño a los eritrocitos a los primeros minutos de incubación; esto posiblemente sea debido a la gran susceptibilidad de los eritrocitos empleados en nuestros ensayos. El 50 % de hemólisis en la P30 obtenida en PEHPS-CV fue alcanzado en 23.8 min y en PEHPS-SV a los 63 min de incubación (Fig 5). Observamos que la P30 proveniente de PEHPS-CV fue 2.65 veces mas activa que la P30 de PEHPS-SV. Una relación similar la encontramos en las curvas dosis-respuesta con ambos tratamientos la P30 obtenida en PEHPS-CV fue 2.43 veces mas activa que la P30 de PEHPS-SV (Fig. 6).

Los datos anteriores demuestran que la presencia de vitaminas 107 de Diamond incrementa alrededor de 2.5 veces la actividad hemolítica producida por la fracción subcelular P30, lo cual nos sugiere que uno o varios componentes de esta mezcla vitamínica puede estimular: **a)** la producción de mas proteína lítica, **b)** favorecer una mayor concentración de un cofactor o **c)** seleccionando una subpoblación de amibas que resulte con más virulencia.

Enseguida comprobamos que la P30 obtenida con ambos tratamientos (PEHPS-CV y PEHPS-SV), al igual que en la actividad hemolítica antes descrita, podía incrementar la actividad de fosfolipasa  $A_2$  presente en esta misma fracción. Ya que esta actividad se ha sugerido que pudiera estar involucrada como un factor de virulencia en las amibas (Ravdin, J. I y Guerrant, R. L. 1982; Vargas-Villarreal, J. et al. 1995). Probamos esta hipótesis y encontramos que las fracciones P30 en ambos tratamientos, presentan actividad de fosfolipasas del tipo  $A_2$  cuantificable y reproducible, lo cual es dependiente tanto del tiempo de incubación como de la dosis (Fig. 7 y 8). En relación con el tiempo de incubación, encontramos que, la P30 obtenida en ambos tratamientos no presenta una fase Lag, lo cual indica que la actividad de la fosfolipasa  $A_2$  comienza a hidrolizar tan pronto como la enzima entra en contacto con el substrato y la actividad de fosfolipasa parece ser de acción directa, es decir no requiere de la presencia de factores líticos directos como ácidos grasos libres y lisoderivados, para llevar a cabo su actividad (Fig. 7). Con respecto a la dosis la actividad de fosfolipasa del tipo  $A_2$ , encontramos un incremento en la producción de los ácidos grasos libres entre 0 y 150  $\mu\text{g}$  de P30 en ambos tratamientos (Fig. 8). Es de llamar la atención que en ambas gráficas la diferencia entre la P30 obtenida de PEHPS-CV y de PEHPS-SV fue de 2.8 veces respectivamente. Esta actividad se comportó en forma y proporcionalidad a los resultados encontrados en la actividad hemolítica que

fue de 2.5 veces la diferencia de la potencia de un tratamiento con respecto al otro tratamiento.

Mas tarde, determinamos el efecto de los trofozoítos enteros cultivados en PEHPS-CV y PEHPS-SV y su capacidad para producir abscesos hepáticos amibianos, ya que este es otro parámetro que se usa para medir virulencia en las amibas. Para realizar este objetivo, decidimos utilizar como modelo experimental al Hámster Sirio Dorados (*Mesocricetus auratus*), ya que esta especie animal ha demostrado claramente una sensibilidad a la producción de abscesos hepáticos producidos por los trofozoítos de *E. histolytica*. (Kretschmer, R. R. 1994; Saíd-Fernández, S., y Mata-Cárdenas, B. D. 1992). Las imágenes fotográficas presentadas en este trabajo (Fig.9 y 10), nos permitieron observar que las lesiones producidas por las amibas cultivadas en el medio PEHPS-CV fueron en proporción y tamaño 3.25 veces mayores (Fig. 9), que los abscesos encontrados en el tratamiento PEHPS-SV (Fig 10). Esto pudo ser debido a que la virulencia de los trofozoítos con vitaminas: **a)** incrementaron la síntesis de algún factor de virulencia o **b)** que la presencia de las vitaminas este seleccionando una subpoblación de amibas que sea más virulenta.

Hasta ahora se han propuesto aisladamente varias moléculas citolíticas para los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* que se han identificado, y aún purificado algunos factores que podrían actuar como tales para producir las

lesiones. Es muy probable que todas ellas, y aún más, participen en la destrucción tisular y por lo tanto la propiedad citolítica de *E. histolytica* sea un mecanismo multifactorial en el que es posible que algún factor o factores presentes en las vitaminas 107 de Diamond pudieran estar implicados en la producción de algún factor de virulencia, o que esté involucrado como cofactores enzimáticos o bien seleccionando una subpoblación de amibas que sea más virulenta. El conocimiento más profundo de esta participación de las vitaminas 107 de Diamond permitirá determinar la contribución específica de esta en los mecanismos citolíticos de *E. histolytica*.

## 6. CONCLUSIONES

1.- Confirmamos que en el medio PEHPS las amibas de la cepa HM1:IMSS cultivadas en presencia de las vitaminas 107 de Diamond, no presentaron un incremento estadísticamente significativo con respecto a las amibas cultivadas en ausencia de estas vitaminas; ya que su tiempo de generación, tiempo de duplicación y velocidades de crecimiento fueron similares.

2.- Encontramos que la P30 obtenida de las amibas cultivadas en PEHPS-CV incrementaron 2.5 veces la actividad hemolítica 50 ( $HD_{50}$ ) con respecto a la P30 obtenida en medio PEHPS-SV.

3.- También obtuvimos un incremento de 2.75 veces en la actividad fosfolipásica del tipo  $A_2$  de P30 obtenida de amibas cultivadas en PEHPS-CV con respecto a la P30 obtenida de amibas cultivadas en PHPS-SV.

4.- Los trofozoítos obtenidos en presencia de las vitaminas 107 de Diamond incrementaron 3.25 veces el tamaño de los abscesos con respecto a los trofozoítos obtenidos en ausencia de estas vitaminas.

## **7. PERSPECTIVAS**

Como objetivo siguiente nos propondremos obtener información de cual o cuales son los componentes que están presentes en las vitaminas 107 de Diamond que es o son los responsables para incrementar estos factores de virulencia evaluados en esta tesis. Se propone además determinar si algunos RNA-mensajeros en las amibas se incrementan con la presencia de dichos componentes presentes en las vitaminas y poder determinar por biología molecular la presencia e identificación de los posibles RNA-mensajeros correspondientes.

## 8. REFERENCIAS

- Brandt, H., Perez-Tamayo, R.** Amibiasis. La Prensa Médica Mexicana 1-91.
- Carliss, J.O., Gojdies, M., Hall, R.D., Kudo R.R., Levine, N.D., Loeblich, A.R., Jr., Weiser J. And Wenrich, D.H.** (1969). A revised clasification the Philus Protozoa *J. Protozool.* Pp 11-7.
- Cleveland, R.L., Sanders, E.P.** (1930). Encystation, multiple fission without encysment, encystation,metacystic development, and variation in a pure line strain of *Entamoeba histolytica*. *Archiv. Fr. Protistenkunde.* **70**: pp 223.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S. And Wood, W. B.** (1973). *Microbiology* 2ª Ed. Pp: 632. Harper &Ron, N.Y.
- Dawson B y Trapp RG.** (1993). *Bioestadística Médica.* Ed. El Manual Moderno S.A. de C:V. Pp 174-175.
- Dennis, E.A.** (1983). Phospholipases. In Boyer. P. (Ed). *The Enzymes*, Chap 9 Vol. XVI. Academic Press, New York,:Pp. 307-353
- Deschiens, R.L.** (1965). Amibiase et 1 Amibe Disenterique. Masson, Paris.
- Diamond LS.** (1968). Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Schaudinn, 1903 and E. Histolytica-like amebae. *J. Parasitol* **54**: pp 1047-1056.
- Diamond LS, Harlow D y Cunnick CC** (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba* *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**: pp.431:432.

- Dobell, C.** (1928). Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I. General introduction. II. Description of the whole life-history of *Entamoeba histolytica* in cultures. *Parasitology*. **20**: 357.
- Eldson-Dew, R.** (1968). The Epidemiology of Amibiasis: *Advance in Parasitology* **6**: pp. 1-62.
- Faust, E. C. Russell, P. F. And Jung, R. C.** (1974). *Parasitología Clínica*. Ed. Salvat. México. Pp.133-170.
- González-Garza, M.T., Castro-Garza, J., Anaya-Velázquez, F., Mata-Cárdenas, B.D., Lozano-Garza, G., Carranza-Rosales, M.P., Vargas-Villarreal, J and Said-Fernández, S.** (1996). Anti-amoebic effect of gossypol in golden hamsters with experimental hepatic amoebic abscess. *Pharmaceutical Sciences* **2**: pp 153-156.
- Guerrant, R.L.** (1986). The Global Problem of Amibiasis Current status, research needs and opportunities for progress. *Rev. Infect. Dis.* **8**: pp. 218-227.
- Gutiérrez, G. y Muños, O.** (1994). Epidemiología de la amibiasis. Amibiasis Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas, México. Pp. 207-225.
- Harkness, J.E and Wagner, J.E.** (1980). *Biología y Clínica de Conejos y Roedores*. Ed. Acribia. Pp. 23-29.
- Hawthorne, S.N., Ansell, G.B.** (1982) Phospholipids. Edición Elsevier Biomedical. Press Amsterdam, N.Y, Oxford. 313.
- Horton H. R; Moran L. A.; Ochs R. S.; Rawn J.D. y Scrimgeour K.G.** (1995). Bioquímica.Ed. Prentice-Hall Hispanoamerica. Pp. 7-4.
- Hysmith, M. y Franson, R. C.** (1982). Elevated leveles of cellular and extracellular phospholipase from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochem. Bioph. Acta.* **711**: pp. 26-32.

- Kott, H. Y Y, Kott. (1970).** On the resistance of *Entamoeba histolytica* to the environment. *J. Protozool.* 17 supp. 30.
- Kretschmer, R.R. (1994).** Amibiasis Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. 1ª Edición. pp. 139-142.
- Larsh, J.E., Jr. Medical Parasitology. (1972).** En "Microbiology" (W.K. Joklik and D.T. Smith, (Ed) Chapter 94. pp. 1023-1043.
- Lehninger, A. L. (1979).** Bioquímica. Ed. Omega. S. A. Barcelona España. pp.307-312.
- Levine, N.D., Carliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux,G., Grain, J., Honingerg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lin, D., Lom, J., Merinfeld, E.G., Page, F.C. Poljansky,G., Sprague, V., Vavra, J. And Walalace, F.G. (1980).** A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 7 (1) 37
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.S., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951)** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 183: pp. 265-275.
- Martínez-Palomo, A. (1982).** The Biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press. John Wiley, Sussex, U.K. 161.
- Martinez-Palomo, A. (1989).** Amibiasis. Ed. Medica Panamericana S.A. pp. 52-54.
- Mata-Cardenas BD y Said-Fernández S. (1990).** Desarrollo de un medio simplificado para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd.* 21: pp. 247-251
- Mata-Cárdenas B.D.** Determinación de la auxotrofia de *Entamoeba histolytica* para colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos. *Tesis de Doctorado.* Enero de 1998.

- Opperdoes, F. R., y VanRoy, J.** (1982). The phospholipase of *Trypanosoma cruzi* bloodstream form and cultured procyclics *Mol Biochem. Parasitol.* **5**:pp. 309-319.
- Prasad, A. K., Das, S. R. y Sagar, P.** (1982). Hemolysis: An in vitro model to investigate tissue necrotic activity of *Entamoeba histolytica*. *Ind J Exptl. Biol.* **20**: 721-725.
- Ravdin, J. I and Guerrant, R. L.** (1982). A Review of the Parasite Cellular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Amebiasis. *Rev Infect Dis.* **4**: pp. 1185-1207.
- Ravdin, J. I. And Guerrant R. L.** (1982). Separation of Adherence Cytolytic and Phagocytic Event in the Cytopathogenesis Mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med.* **13** (Supl. 3): 123.
- Roa, V. G. And Padma, M. C.** (1971). Some Observations on the Pathogenicity of Strains Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Amebiasis. *Rev. Infect. Dis.* **4**: pp. 1185-1207
- Rosenberg, P.** (1976). Toxins, Animal, Plant and Microbial. En: 5th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins P Rosenberg (Ed.). Pergamon Press Ltd. Headigton Hill Hall. San Jose Costa Rica,. 1-1134 \*
- Saíd-Fernández S., and López-Revilla, R.** (1982). Subcellular Distribution and Stability of the Major Activity of *Entamoeba histolytica* Trophozoites. *Zeitschrift. Parasitenkunde Research.* **67**: pp. 249.
- Saíd-Fernández S. y López-Revilla, R.** (1986). Free fatty acids generated from endogenous phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **56**: pp 874-879.
- Saíd-Fernández, S., Mata-Cárdenas, B.D.** (1992). Axenic Cultivation of *Entamoeba histolytica* in Suspension. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hygiene:* **86**: 173

- Saíd-Fernández S, Vargas-Villarreal J y Castro-Garza J. (1986).** Mecanismo multifactorial de la actividad citolítica de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd.* **17**: pp. 173-178.
- Saíd-Fernández, S., Vargas-Villarreal, J., Castro-garza, J., Mata-Cárdenas, B., Navarro-Marmolejo, L., Lozano-Garza, G. and Martínez-Rodríguez, H. (1988).** PEHPS Medium: an Alternative for Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hygiene.* **82**: pp. 249.
- Shaffer, J.G., Scatlan, T.M. y B. (1961).** Observations on cell divisions of *Entamoeba histolytica* in culture : *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **10**:pp. 167.
- Skipsky, J.P. y Barclay, M. (1969).** Thin-Layer chromatography of lipids. En J.M. Lowestein (ED). *Methods in Enzymology.. Academic Press*, **14**: pp. 30-599.
- Van Den Bosch, H. (1980).** Intracellular phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta.* **604**: pp. 191.
- Vargas-Villarreal, J., Martínez-Rodríguez, H., Castro-Garza, J., Mata-Cárdenas, B.D., González-Garza, M.T. and Saíd-Fernández, S. (1995).** Identification of *Entamoeba histolytica* Intracellular Phospholipase A and Lysophospholipase L<sub>1</sub> Activity. *Parasitology Res.* **81**: 320-323.
- Vargas-Villarreal, J and Saíd-Fernández S. (1984).** *Entamoeba histolytica*: Cytolytic Activity of Cell-Free Trophozoites Extract Upon Cells. *Arch. Invest. Med.* **15**: pp. 1-12.
- Walsh, J. A. (1986).** Problems and Diagnosis of Amibiasis. Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality. *Rev. Infect. Dis.* **8**: pp. 228-238.
- Who Expert Comité. (1969). Amoebas. Technical Report N°. **421** : pp. 1-52

