

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACTULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EFECTO DE AGENTES QUE MODIFICAN LOS
NIVELES DE 3'.5,-ADENOSIN MONOFOSFATO
CICLICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA
DIFERENCIACION DE Entamoeba invadens

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA,

POR:

M. EN C. AMELIA VALDEZ AGUIRRE

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., MEX.,
JUNIO DE 1999

TD
RC121
.A5
V3
1999
c.1



1080124470

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DIVISIÓN DE QUÍMICA



EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CICLO DE VIDA DE ENTAMOBA INVADENSIS
Y LA DIFERENCIACIÓN DE ENTAMOBA INVADENSIS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGÍA,
POR:

M. EN C. AMELIA VALDEZ AGUIRRE

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L., MEX.,
JUNIO DE 1999



TD
RC121
.AS
V3
1999
C.1



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EFFECTO DE AGENTES QUE MODIFICAN LOS NIVELES DE 3'.5'-ADENOSÍN
MONOFOSFATO CÍCLICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA DIFERENCIACIÓN
DE *Entamoeba invadens*.

TESIS

Presentada como requisito parcial

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias

con especialidad en Microbiología,

por:

M. EN C. AMELIA VALDEZ AGUIRRE

San Nicolás de los Garza, N. L., Méx., junio de 1999.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EFEECTO DE AGENTES QUE MODIFICAN LOS NIVELES DE 3'.5'-ADENOSÍN
MONOFOSFATO CÍCLICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA DIFERENCIACIÓN DE

Entamoeba invadens

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA, POR:

M. EN C. AMELIA VALDEZ AGUIRRE

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. MARIO R. MORALES VALLARTA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EFFECTO DE AGENTES QUE MODIFICAN LOS NIVELES DE 3'.5'-ADENOSÍN
MONOFOSFATO CÍCLICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA DIFERENCIACIÓN DE

Entamoeba invadens

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en
Ciencias con especialidad en Microbiología, por:

M. EN C. AMELIA VALDEZ AGUIRRE.

APROBADA COMISIÓN DE TESIS:

Dr. Mario R. Morales Vallarta.

PRESIDENTE



Dr. Benito D. Mata Cárdenas

SECRETARIO



Dr. Javier Vargas Villarreal

1er. VOCAL

Dra. Licet Villarreal Treviño

2º. VOCAL

Dr. Francisco J. Solís Martínez

3er. VOCAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EFFECTO DE AGENTES QUE MODIFICAN LOS NIVELES DE 3',5'-ADENOSÍN
MONOFOSFATO CÍCLICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA DIFERENCIACIÓN DE
Entamoeba invadens

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA, POR:

M. EN C. AMELIA VALDEZ AGUIRRE

DIRECTOR EXTERNO:



Dr. BENITO DAVID MATA CÁRDENAS.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EFEECTO DE AGENTES QUE MODIFICAN LOS NIVELES DE 3',5'-ADENOSÍN
MONOFOSFATO CÍCLICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA DIFERENCIACIÓN DE

Entamoeba invadens

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA, POR:

M. EN C. AMELIA VALDEZ AGUIRRE

DIRECTOR EXTERNO:



Dr. BENITO DAVID MATA CÁRDENAS.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EFECTO DE AGENTES QUE MODIFICAN LOS NIVELES DE 3'.5'-ADENOSÍN
MONOFOSFATO CÍCLICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA DIFERENCIACIÓN DE

Entamoeba invadens

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA, POR:

M. EN C. AMELIA VALDEZ AGUIRRE

ASESOR EXTERNO:

Dr. FRANCISCO JAVIER SOLÍS MARTÍNEZ.

La fase experimental de este trabajo se realizó en el laboratorio de Genética y Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, del Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, N. L.

Este trabajo se realizó con apoyo, mediante una beca, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	i
LISTA DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
Objetivos específicos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. MATERIAL BIOLÓGICO	15
2. PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE ANTIBIÓTICOS	15
a) Solución concentrada de penicilina	15
b) Solución patrón de penicilina-estreptomicina	15
c) Solución de trabajo de penicilina-estreptomicina	15
3. PREPARACIÓN DEL MEDIO TYI-S-33	16
4. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS	17
5. CINÉTICA DE CRECIMIENTO	17
6. EFECTO DE AGENTES ESTIMULADORES DE LA ADENILIL CICLASA SOBRE EL	18

CRECIMIENTO	
7. EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA DEL AMP _c SOBRE EL CRECIMIENTO.	18
8. MÉTODO DE ENQUISTAMIENTO CON ALTA TENSIÓN DE CO ₂ .	18
9. EFECTO DE AGENTES ESTIMULADORES DE LA ADENILIL CICLASA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE <i>E. invadens</i> .	19
10. EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA DEL AMP _c SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE <i>E. invadens</i> .	19
11. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA DETERMINAR CONCENTRACIÓN DE AMP _c EN TROFOZOITOS.	20
12. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA DETERMINAR CONCENTRACIÓN DE AMP _c EN QUISTES.	20
13. CUANTIFICACIÓN DEL AMP _c .	20
14. TINCIÓN DE HOECHST	22
RESULTADOS	23
I. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>E. invadens</i>	23
II. EFECTO DE INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA DEL AMP _c SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>E. invadens</i> .	23
A) EFECTO DE LA CAFEÍNA	23
B) EFECTO DE LA TEOFILINA	26
III. EFECTO DE AGENTES ESTIMULADORES DE LA ADENILIL CICLASA SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>E. invadens</i> .	26
IV. EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ESTIMULADORES DE LA ADENILIL CICLASA E INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>E. invadens</i>	28
V. EFECTO DE INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA DEL AMP _c SOBRE LA	32

DIFERENCIACIÓN DE <i>E. invadens</i> .	
A) EFECTO DE TEOFILINA 3 mM SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE <i>E. invadens</i> .	32
B) EFECTO DE CAFEÍNA 3 mM	34
C) EFECTO DE DOSIS BAJAS DE CAFEÍNA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE <i>E. invadens</i> .	34
D) EFECTO DE CAFEÍNA Y TEOFILINA 1.5 mM SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE <i>E. invadens</i> .	34
E) EFECTO DEL MATERIAL PRECIPITABLE DEL SUERO BOVINO ESTERILIZADO POR IRRADIACIÓN, SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE <i>E. invadens</i> .	43
VI. EFECTO DE ESTIMULADORES DE LA ADENILIL CICLASA SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE <i>E. invadens</i> .	45
A) EFECTO DE LA L-EPINEFRINA.	45
B) EFECTO DE LA DOPAMINA	45
C) EFECTO DEL NaF	45
V. EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ESTIMULADORES DE LA ADENILIL CICLASA E INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA DEL AMP _c SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE <i>E. invadens</i> .	50
VIII. OBSERVACIÓN CON TINCIÓN DE HOESCHT	50
IX. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMP _c EN TROFOZOITOS DE <i>E. invadens</i> .	53
X. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMP _c EN QUISTES DE <i>E. invadens</i> .	61
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFÍA.	71

LISTA DE FIGURAS

Fig 1. Cinética de crecimiento de <i>E. invadens</i> .	24
Fig 2. Efecto de la cafeína sobre el rendimiento de <i>E. invadens</i> .	25
Fig 3. Efecto de la teofilina sobre el rendimiento de <i>E. invadens</i> .	27
Fig 4. Efecto de la L-epinefrina sobre el rendimiento de <i>E. invadens</i>	29
Fig 5. Efecto de la dopamina sobre el rendimiento de <i>E. invadens</i>	30
Fig 6. Efecto del NaF sobre el rendimiento de <i>E. invadens</i>	31
Fig 7. Efecto del NaF más cafeína sobre el rendimiento de <i>E. invadens</i>	33
Fig 8. Efecto de la teofilina 3 mM y la cafeína 3 mM sobre el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .	35
Fig 9. Efecto de dosis bajas de cafeína sobre el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .	36
Fig 10. Efecto de cafeína 1.5 mM y teofilina 1.5 mM sobre el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .	38
Fig 11. Efecto de cafeína y teofilina sobre el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .	39
Fig 12. Efecto de la cafeína sobre el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .	40
Fig 13. Efecto de dosis altas de cafeína sobre el rendimiento de <i>E. invadens</i> .	42
Fig 14. Efecto del sedimento del suero esterilizado por radiación, sobre el efecto inhibitorio de la cafeína 10 mM sobre el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .	44
Fig 15. Efecto de la L-epinefrina sobre el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .	46
Fig 16. Efecto de la dopamina sobre el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .	48
Fig 17. Efecto del NaF sobre el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .	49
Fig 18. Efecto del NaF + cafeína sobre el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .	51
Fig 19. Quistes de <i>E. invadens</i> teñidos con reactivo de Hoescht.	52

Fig 19. Quistes de <i>E. invadens</i> teñidos con reactivo de Hoescht.	52
Fig 20. Curva estándar para calcular concentración de AMPc.	55
Fig 21. Niveles de AMPc en trofozoítos de <i>E. invadens</i> .	59

INDICE DE TABLAS.

Tabla I. Promedio de las cpm detectadas en trofozoitos de <i>E. invadens</i> en presencia de cafeína 1 mM y de NaF 2.5 mM.	56
Tabla II. Radiactividad detectada en muestras de trofozoitos de <i>E. invadens</i> por el método de Gilman	57
Tabla III. Radiactividad detectada en trofozoitos de <i>E. invadens</i> por el método de Gilman, a las cuales no se les agregó proteína de alta afinidad por el AMPc.	58
Tabla IV. Niveles de AMPc en trofozoitos de <i>E. invadens</i> incubados en presencia de cafeína 3 mM o de NaF 2.5 mM.	59
Tabla V. Radiactividad detectada en quistes de <i>E. invadens</i> inducidos en presencia de cafeína 5 mM o de NaF 2.5 mM.	62
Tabla VI. Radiactividad detectada en quistes de <i>E. invadens</i> inducidos en presencia de cafeína 5 mM o de NaF 2.5 mM, sustituyendo la proteína de alta afinidad por solución amortiguadora Tris-EDTA-Glc-NaCl.	63
Tabla VII. Concentración de AMPc en quistes de <i>E. invadens</i> en presencia de cafeína 5 mM o de NaF 2.5 mM.	63

ABREVIATURAS

8 Br-AMPC	8 Bromo 3'-5' adenosin monofosfato cíclico
AMPC	3'-5'adenosin monofosfato cíclico
Cpm	Cuentas por minuto
EDTA	Etilén diamino tetra acetato disódico
Fig	Figura
Fmol	Femtomo
g	gramo
g	Unidad gravitacional
Glc	Glucosa
l	Litro
Lb/pulg²	Libra por pulgada cuadrada
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milimetro
Mrad	Megarad
pmol	Picomol
RNA_m	Acido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto

seg

Segundo

μm

Micrómetro

RESUMEN.

El proceso de diferenciación de *Entamoeba histolytica*, agente causal de amibiasis intestinal y absceso hepático en humanos, a la fecha no se ha podido inducir *in vitro*; es por eso que se ha utilizado como modelo alternativo a *E. invadens* para estudiar la diferenciación de estos protozoarios. *E. invadens* es un parásito de reptiles y produce una patología semejante a la causada por *E. histolytica* en humanos; además este protozoario enquistado *in vitro*, por lo cual es hasta hoy, la única alternativa para el estudio del proceso de diferenciación de este protozoario.

El 3'.5'-adenosín monofosfato cíclico (AMPc) tiene un papel importante en la fisiología de células normales y transformadas y hay evidencias de que participa en procesos de diferenciación y crecimiento de algunos eucariotes unicelulares como *Hartmanella culbertsoni*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma lewisi* y *Dictyostelium discoideum*. Por lo tanto, ya que la diferenciación y el crecimiento son regulados por el AMPc en muchos eucariotes unicelulares, probablemente también participe en la regulación del crecimiento y la diferenciación del género *Entamoeba*, por lo cual nos propusimos determinar los efectos de cafeína y teofilina, inhibidores de la fosfodiesterasa del AMPc, así como NaF, L-epinefrina y 2 hidroxitiramina (dopamina), estimuladores de la adenilil ciclasa, sobre el crecimiento y la diferenciación de *E. invadens*.

Para ello se cultivaron trofozoitos de *E. invadens*, cepa IP-1 en medio TYI-S-33, agregando diferentes dosis de las drogas. Para inducir el enquistamiento se gasearon los cultivos con CO₂ y se incubaron 4 días a 25°C, para luego sustituir el medio por TYI-S-33 sin glucosa (LG), agregando diferentes concentraciones de las drogas y gaseando nuevamente con CO₂.

Cuando se usó suero esterilizado por irradiación con una dosis de 1 Mrad para completar el medio, tanto la cafeína como la teofilina inhibieron la diferenciación de manera directa y dependiente de la concentración, siendo significativas las dosis de 1, 2, 3 y 5 mM. Así mismo, estas drogas tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento amibiano; este efecto también dependió de la dosis, a partir de una concentración de 3 mM.

No se observó efecto alguno de la epinefrina y la dopamina sobre el enquistamiento ni sobre el crecimiento de *E. invadens* a dosis de 10^{-5} y 10^{-4} M, mientras que el NaF mostró un efecto inhibitorio sobre el crecimiento a partir de una concentración de 2.5 mM. Este compuesto también tuvo un efecto inhibitorio sobre el enquistamiento, pero a partir de concentraciones de 0.5 mM.

La combinación de NaF y cafeína mostraron un efecto aditivo de inhibición sobre el crecimiento y la diferenciación del parásito, cuando se utilizan las dosis más bajas que habían mostrado efecto inhibitorio sobre estos procesos celulares.

Los niveles intracelulares de AMPc en trofozoitos de *E. invadens* son mucho menores que en otros sistemas celulares. Estos niveles disminuyen gradualmente durante el crecimiento de un valor de 12.6 a 0.2 fmol/célula. Sin embargo, en presencia de NaF 2.5 mM, los niveles de AMPc siguen un comportamiento inverso, pues al inicio son bajos (2.6 fmol/célula) y van aumentando hasta llegar a 9.9 fmol/célula. En cambio, los niveles de AMPc en las amibas que crecieron en presencia de cafeína 1 mM se mantuvieron bajos durante todo el periodo de crecimiento, pues pasaron de 1.1 a 0.2 fmol/célula.

Los niveles de AMPc en los quistes son más bajos que en los trofozoitos. Cuando los quistes son inducidos en presencia de cafeína o de NaF, la concentración de AMPc es mayor que los inducidos en ausencia de estas drogas. Esto sugiere que el

AMPc juega un papel importante en el proceso de diferenciación del género *Entamoeba*, aunque el mecanismo que dispara este proceso es muy complejo y diferente de lo que ocurre en otros sistemas celulares.

Durante la realización de los ensayos de determinación de los niveles de AMPc, tanto en quistes como en trofozoítos se hizo evidente la posible presencia de un factor soluble en los lisados, el cual tiene alta afinidad por AMPc; probablemente este factor tenga un papel importante en la regulación de los niveles citoplasmáticos de AMPc libre y por lo tanto, también en el proceso de diferenciación de *E. invadens*.

INTRODUCCIÓN.

En todos los organismos superiores hay comunicaciones intercelulares, entre las cuales las más conocidas y estudiadas son la comunicación directa célula-célula y la que ocurre mediante mensajeros químicos, particularmente donde intervienen hormonas polipeptídicas. Dentro de esta última encontramos dos muy importantes: la transmisión nerviosa y la endócrina que, aunque con funciones diferentes, muestran mecanismos bioquímicos semejantes. Ambas vías tienen en común que las hormonas polipeptídicas y los neurotransmisores, constituyen la señal externa y se consideran como primeros mensajeros, los cuales se unen a receptores en la membrana plasmática de las células blanco (Snyder, 1985), desencadenando la formación de mensajeros secundarios, induciendo éstos una serie de reacciones dentro de la célula, que tendrán como consecuencia la realización de una función celular específica.

Sutherland y col. (1972) descubrieron que la acción de la adrenalina o del glucagon sobre el metabolismo están mediados por un compuesto que se sintetiza en el interior de las células hepáticas, el cual es el responsable de los efectos producidos por dichas hormonas, como consecuencia de la unión de éstas con su receptor (Gill y Garren, 1971). Posteriormente, este compuesto fue identificado como 3',5' adenosín monofosfato cíclico (AMPC), el cual está presente en todos los seres vivos y tiene un papel clave en el control de muchos procesos biológicos. La síntesis de esta molécula reguladora a partir del ATP está catalizada por la adenilil ciclasa, una enzima asociada a la membrana plasmática y esta síntesis es acelerada por la hidrólisis posterior del AMPC, el cual queda convertido en 5' AMP por la acción de la fosfodiesterasa del AMPC (Conti y col, 1991).

Las hormonas polipeptídicas, los neurotransmisores, ciertas toxinas y otras moléculas reguladoras son capaces de interactuar con el receptor correspondiente, el cual se encuentra en la cara externa de la membrana plasmática y puede inducir una respuesta de la célula; a estos compuestos se les llama agonistas; así, pues, un antagonista es una sustancia capaz de interactuar con el receptor e impedir la unión de ésta con el agonista, inhibiendo su efecto (Stadel y Lefkowitz, 1991).

Cuando un agonista interactúa con su receptor correspondiente, éste sufre una modificación conformacional, de modo que se vuelve capaz de interactuar con una proteína que se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática; cuando se trata de un agente que activa a la adenilil ciclasa, su receptor lo hará con una proteína estimuladora, mientras que si se trata de uno que inhibe a la enzima, su receptor lo hará con una proteína inhibidora. Una condición importante del modelo del segundo mensajero mencionado anteriormente, es que el primer mensajero (hormona) no necesita entrar a la célula y los efectos producidos por éste, son mediados por el AMPc generado en el interior de la célula (Sutherland, 1972).

El AMPc se sintetiza a partir del ATP, mediante una reacción catalizada por la adenilil ciclasa (4.6.1.1 ATP pirofosfato liasa ciclizante) (Barman, 1969), la cual es activada por una proteína intermediaria llamada proteína guanidínica o proteína G, la cual es, a la vez, activada por la interacción del receptor unido al primer mensajero específico. La proteína G está constituida por 3 subunidades: la α , de 45 ; la β , de 35 y la γ de 7 Kd. La subunidad α está asociada a GDP cuando se encuentra inactiva. La activación de la adenilil ciclasa se lleva a cabo cuando el primer mensajero se une al receptor de membrana y permite que el GDP unido a la subunidad α de la proteína G sea intercambiado por GTP, activando el complejo; la subunidad α de esta proteína se disocia de la β y la γ , uniéndose y activando a la adenilil ciclasa (Stadel y Lefkowitz, 1991).

La inactivación de la adenilil ciclasa se lleva a cabo cuando la GTPasa, presente en la subunidad α , hidroliza el GTP a GDP; esta hidrólisis provoca la disociación de esta subunidad de la adenilil ciclasa. Después, la subunidad α se reasocia de nuevo con las subunidades β y γ , comenzando de nuevo el ciclo. Las proteínas G participan en muchos procesos de transducción de señales. A las proteínas G con actividad estimuladora, se le llama Gs (Linder y Gilman, 1992).

El AMPc generado como consecuencia de la interacción hormona-receptor, a la vez es reconocido por otro receptor: la proteína cinasa A para AMPc (Voet y Voet, 1990). Esta proteína cinasa tiene dos tipos de subunidades: las subunidades R o reguladoras y las C o catalíticas, las cuales son las responsables de la actividad de proteína cinasa propiamente dicha. Las subunidades R mantienen inhibida la enzima y cuando se disocian de las C, éstas ejercen su acción catalítica (Linder y Gilman, 1992).

La función básica de los segundos mensajeros como el AMPc es activar las enzimas, las cuales, a su vez, fosforilan a otras proteínas para modificar su actividad (Glass y Krebs, 1980). La acción catalítica de la adenilil ciclasa eleva los niveles intracelulares de AMPc, los cuales son regulados por la enzima fosfodiesterasa del AMPc (3.1.4.1 ortofosfodiéster hidrolasa), la cual hidroliza el enlace 3' fosfodiéster del AMPc para dar como producto el 5' AMP (Conti y col., 1991). La adenilil ciclasa se encuentra en casi todas las células animales y dependiendo del tipo de célula, puede ser estimulada por diversas hormonas. Éstas incluyen varias aminas biogénicas tales como epinefrina (Oye y Sutherland, 1966) y dopamina (Stiles, 1991); proteínas como la insulina (Hep y Renner, 1972) y algunas prostaglandinas (Kelly y Butcher, 1974). Otros agentes que también estimulan la actividad de la adenilil ciclasa son el ion Fluoruro (Hebdon y col, 1978), la toxina del cólera y otras toxinas bacterianas (Spangler, 1992; Pierce y col, 1971).

ANTECEDENTES.

El AMPc tiene un papel importante en el control del crecimiento de células en cultivo. Según los estudios de Burk (1968), la cafeína y la teofilina, agentes inhibidores de la fosfodiesterasa del AMPc, disminuyen el crecimiento de las células BHK, tanto las normales como las transformadas. Así mismo, la teofilina induce el enquistamiento de *Hartmanella culbertsoni* (Verna y col, 1974). Estas drogas inhiben la actividad de la fosfodiesterasa del AMPc y aumentan los niveles de AMPc en dichas células. Por su parte, Ryan y Heidrich (1968) encontraron que el AMPc por sí mismo inhibe el crecimiento de las células HeLa.

Análogos del AMPc, tales como el dibutiril AMPc (dbAMPc) y el 8 Cl-AMPc disminuyen la proliferación de células de embrión de rata (Frank, 1972) y también este mismo efecto se ha encontrado en agentes que estimulan la actividad de la adenilil ciclase, tales como la epinefrina y la prostaglandina E1 (Kelly y Butcher, 1974).

Se han determinado los niveles de AMPc en células normales y en células transformadas y se ha observado que existe una relación inversa entre los niveles de AMPc y el crecimiento (Oten y col., 1971 y 1972). Además, en las células que presentan inhibición del crecimiento por contacto, el nivel de AMPc se ve aumentado, mientras que en las líneas celulares que carecen de esta propiedad, la concentración de AMPc se encuentra disminuida con respecto a las normales (Puck, 1977). Otra evidencia que sugiere que el AMPc juega un papel importante en la regulación del crecimiento de las células transformadas, es que éstas han perdido la inhibición por contacto pero adquieren esta característica cuando se agrega AMPc al medio (Sheppard, 1971; Cho Chung y col, 1991). También se han encontrado evidencias de

que el AMPc controla una gran variedad de funciones en los hongos, tales como la utilización de fuentes de carbono exógenas, la conidiación, el dimorfismo sexual y el fototropismo (Pall, 1981).

El AMPc tiene además un papel muy importante en la diferenciación de diversos organismos. Por ejemplo *Trypanosoma lewisi* pasa de su fase reproducible no infectiva, a otra no reproducible e infectiva; esto es inducido por la acción de los anticuerpos generados en el hospedero, con un incremento considerable en los niveles de AMPc (Strickler y Patton, 1975).

Utilizando activadores de la adenilil ciclasa, AMPc o derivados del mismo, tales como el dibutiril AMPc (dbAMPc) y/o 8-Br-AMPc, se ha determinado que el AMPc tiene un papel importante en el proceso de diferenciación *in vitro* de *T. cruzi*; estos hallazgos fueron corroborados al observar el efecto de agentes activadores de la adenilil ciclasa sobre la diferenciación de este parásito (González-Perdomo y col, 1988).

Por otra parte, *H. culbertsoni*, protozooario de vida libre, presenta dos fases en su ciclo de vida: el quiste y el trofozoíto. El enquistamiento, caracterizado por la formación de una pared celular, ocurre cuando el medio ambiente se vuelve adverso. La forma trófica se diferencia a quiste cuando en el medio de cultivo hay escasez de nutrientes o por la presencia exógena de bioaminas, tales como la L-epinefrina, dopamina o tiramina (Verma y col, 1974), las cuales inducen un incremento en los niveles de AMPc intracelular. Los efectos causados por estas sustancias sobre *H. culbertsoni* son imitados por AMPc o por dbAMPc; el enquistamiento de este protozooario inducido por las bioaminas y/o el AMPc puede ser inhibido por la presencia de actinomicina D; esto sugiere que el AMPc actúa a nivel transcripcional (Raizada y Krishna-Murti, 1972).

Dictyostelium discoideum presenta una fase amiboidea o de crecimiento y otra fase de resistencia, con formación de esporas. Cuando el sustrato bacteriano es escaso, las amibas comienzan a agruparse para formar un agregado inducido por la concentración de AMPc extracelular, el cual forma centros de agregación y es vertido al medio por las amibas; se forma un pseudoplasmodio que pasa por diversos estadios hasta transformarse en un cuerpo fructífero (Gerisch, 1987). El AMPc, además de controlar el movimiento quimiotáctico para la agrupación de las amibas, también estimula la síntesis de AMPc para su liberación en el medio ambiente (Williams, 1988) y constituye un factor que promueve la diferenciación (Watts, 1984; Mann y Firtel, 1991). El contacto célula-célula, además del AMPc, es necesario para la formación de las esporas en este organismo (Kay, 1982).

El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* comprende dos fases principales: el quiste y el trofozoíto. Este último constituye la forma móvil, con capacidad de invadir tejido; mide de 7 a 40 μm de diámetro. Su forma es alargada y regular; presenta lobópodos, uroide y una superficie rugosa; carece de aparato de Golgi y de mitocondrias y es muy sensible a los cambios de pH, temperatura y osmolaridad (Martínez-Palomo, 1982).

Los quistes miden un promedio de 12 μm de diámetro; constituyen la fase infectiva y de resistencia del parásito, ya que soportan la acción de detergentes, cambios de temperatura y osmolaridad; tienen una pared que se tiñe con calcoflúor M2R, lo cual indica que está formada por polímeros de carbohidratos (Arroyo-Begovich y col, 1980; 1982). Tienen de 1 a 4 núcleos ; contiene cuerpos cromatoidales, los cuales son agregados de ribosomas (Shvla y Backer, 1961); posee una pared de 125 a 250 nm de grosor compuesta de elementos fibrilares a manera de cubierta (Chávez y col, 1978) la cual, posiblemente, al igual que en *E. invadens*, está constituida principalmente de quitina (Arroyo-Begovich y col., 1982).

E. histolytica es el agente causal de la disentería amibiana y del absceso hepático en humanos. Esta enfermedad es causa de 40 mil a 110 mil muertes al año y se estima que en la Cd. de México, el 25% de la población total está infectada por este parásito (Walsh, 1986). También se ha estimado que existe una persona con amibiasis invasiva por cada 4 ó 5 portadores asintomáticos (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1982).

A pesar de que se sabe que el quiste es la forma infectiva de este parásito, la diferenciación de los trofozoítos de *E. histolytica* en quistes, así como el desenquistamiento, son aspectos de la biología del parásito que han sido poco explorados. La formulación de medios de cultivo, especialmente los axénicos (Diamond y col, 1978; Saíd-Fernández y col, 1988; Mata-Cárdenas y Saíd-Fernández, 1990), ha permitido establecer cultivos masivos de trofozoítos y el estudio intensivo de los mismos. Sin embargo, no ha sido posible obtener cultivos en los cuales ocurra una diferenciación masiva. Se ha reportado que en cultivos monoxénicos ricos en magnesio o en medio de Jones, los trofozoítos de *E. histolytica* experimentan cambios morfológicos y químicos con características de prequiste, los cuales expresan glicoproteínas tanto en su superficie como en su citoplasma (Avron y col, 1986).

Por otra parte, se han logrado establecer cultivos de *E. histolytica* en medio PEHPS (Saíd-Fernández y col, 1988), los cuales, además de favorecer la diferenciación de los trofozoítos, permiten obtener grandes cantidades de quistes inmaduros, con la gran ventaja de que los cultivos son axénicos, aunque es corto el tiempo que permanecen viables (Saíd-Fernández y col, 1992; 1993). Así mismo, con la utilización de CO₂ en el medio de cultivo, se han obtenido formas semejantes a quistes, con cuerpos cromatoides, multinucleados y la evidencia de una pared celular (Morales-Vallarta y col, 1997). Sin embargo, no se ha obtenido todavía una metodología reproducible y segura que dé cantidades masivas de quistes maduros.

Las dificultades encontradas para inducir la diferenciación de trofozoítos a quistes *in vitro* de *E. histolytica* han obligado a los investigadores a trabajar con cultivos de *E. invadens*, un parásito que puede producir daño generalizado con disentería en reptiles (Geiman y Ratcliffe, 1936). El enquistamiento de este parásito requiere la función de proteosomas (González y col, 1997); esta especie es menos susceptible a cambios en la composición del medio y produce altos rendimientos de quistes (Diamond y Bartigs, 1972). Una ventaja adicional de *E. invadens* es que los trofozoítos enquistan fácilmente en medio axénico mediante modificación en el medio como son la tonicidad, la concentración de glucosa o la tensión de CO₂ (Avron y col, 1986; Vazquezdelara-Cisneros y Arroyo-Begovich, 1984; Rengpien y Bailey, 1975; Morales-Vallarta y col, 1997).

A pesar de la incertidumbre en cuanto a la validez de poder extrapolar los resultados a *E. histolytica*, los cultivos de *E. invadens* deben ser considerados como una buena alternativa cuando se requieren grandes cantidades de quistes o cuando se desea analizar el proceso de enquistamiento o de desenquistamiento. Aunque *E. invadens* puede enquistar *in vitro* en medio axénico, los estudios del proceso de enquistamiento han sido relativamente escasos.

Como se ha mencionado en los antecedentes, es evidente que el AMPc juega un papel importante en los procesos de diferenciación y crecimiento en diferentes sistemas biológicos. Además, se ha reportado que en *E. histolytica*, este nucleótido tiene un efecto modulador sobre la organización del citoesqueleto del trofozoito y sobre la regulación de los niveles de RNAm de actina (Manning-Cela y Meza, 1996). También se ha reportado que hay una correlación directa entre los altos niveles de AMPc y los cambios observados en la organización del citoesqueleto y la transcripción del RNAm de actina (Manning-Cela y col, 1997). Así mismo, se han presentado evidencias de que la histamina tiene un papel importante sobre la diferenciación de *E. histolytica*

(Nayeem y col, 1993), no existen reportes acerca del efecto del AMPc sobre el crecimiento y la diferenciación de este parásito u otros parásitos del género *Entamoeba*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se mencionó anteriormente, el AMPc tiene efectos importantes en el crecimiento de células normales de mamíferos y de células transformadas, así como en la regulación del ciclo de vida de *D. discoideum*. Por otra parte, en *H. culbertsoni* (Watts, 1984; Mann y Firtel, 1991), en *T. cruzi* y *T. lewisi* (Strickler y Patton, 1975; Rangel-Aldao, 1987), se ha observado que al menos uno de los factores responsables de iniciar el proceso de diferenciación, es el AMPc. Con base en los antecedentes, resulta obvia la importancia del AMPc en los distintos niveles evolutivos de los diferentes sistemas biológicos. Sin embargo, no existen reportes acerca del efecto del AMPc sobre el crecimiento y/o diferenciación de parásitos del género *Entamoeba*.

Ante la necesidad de contar con grandes cantidades de quistes en forma axénica, con el fin de determinar cuál es el efecto del AMPc sobre el crecimiento y la diferenciación del parásito, se ha recurrido a la alternativa de utilizar como modelo a *E. invadens* en estudios de diferenciación amibiana.

Dado que el quiste es la fase infectiva de *E. histolytica*, es de gran importancia un conocimiento más profundo de la biología del parásito que permita el diseño de estrategias de control contra el mismo, ya que la amibiasis es un problema mundial de salud (Walsh, 1986). Si bien hasta hoy no ha sido posible la obtención de quistes maduros de *E. histolytica* en cantidades suficientes para realizar estudios bioquímicos, para *E. invadens*, parásito que produce en reptiles los mismos síntomas que *E. histolytica* en el hombre, esto sí es posible, y este modelo es usualmente utilizado para el estudio de la diferenciación de *Entamoeba*.

HIPÓTESIS

En vista de que los procesos de diferenciación y crecimiento son regulados por el AMPc entre otros factores en eucariotes unicelulares, posiblemente este nucleótido también esté involucrado en la regulación del crecimiento y la diferenciación de *Entamoeba*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de agentes que modifican los niveles intracelulares de AMPc sobre el crecimiento y la diferenciación de *E. invadens*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los efectos de agentes estimuladores de la adenilil ciclasa sobre el crecimiento y la diferenciación de *E. invadens*.
2. Determinar los efectos de agentes inhibidores de la fosfodiesterasa del AMPc sobre el crecimiento y la diferenciación de *E. invadens*.
3. Determinar los efectos de la combinación de agentes estimuladores de la adenilil ciclasa e inhibidores de la fosfodiesterasa del AMPc sobre el crecimiento y la diferenciación de *E. invadens*.
4. Determinar los niveles de AMPc en trofozoitos y en quistes de *E. invadens*.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizó la cepa IP-1 de *E. invadens*, la cual tiene capacidad de enquistar en medio de cultivo axénico y fue proporcionada por el laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, del Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, N. L. Los trofozoitos se cultivaron en tubos de 17 x 150 mm con tapón de rosca, conteniendo 10 ml de medio TYI (Diamond y col, 1978), complementado con 1 ml de suero de bovino adulto y 0.1 ml de mezcla de penicilina-estreptomina (ver más adelante: mezcla de antibióticos). El suero utilizado fue esterilizado por filtración o por aplicación de una dosis de 1.5 Mrad de radiación γ ^{60}Co , lo cual fue realizado en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

2. PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE ANTIBIÓTICOS.

a) SOLUCIÓN CONCENTRADA DE PENICILINA.

A un frasco ampula de 1 000 000 U de penicilina G sódica cristalina Lakeside, se le inyectaron con jeringa y aguja estériles, 5 ml de agua tridestilada estéril para disolver la penicilina.

b) SOLUCIÓN PATRÓN DE PENICILINA-ESTREPTOMICINA.

A un frasco ampula de sulfato de estreptomina Lakeside (1 g) se le agregó, bajo condiciones de esterilidad, la solución concentrada de penicilina y se agitó para disolver la estreptomina (Lakeside).

c) SOLUCIÓN DE TRABAJO DE PENICILINA-ESTREPTOMICINA.

En un tubo cónico de plástico estéril se vertió la solución patrón de penicilina-estreptomicina del frasco ampula, midiendo con la jeringa el volumen de esta solución. Se agregó el volumen de agua tridestilada necesaria para completar 20 ml. Se hicieron alicuotas de 5 ml en tubos estériles con tapón de rosca de 13 x 100 mm, etiquetados con la fecha de preparación y se almacenaron a -20°C cubiertos con papel aluminio.

3. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO TYI-S-33 (Diamond y col, 1978).

COMPONENTES	g/100 ml H ₂ O
Tripticasa (Bioxon)	2.00
Extracto de levadura (Bioxon)	1.00
Glucosa (Sigma)	1.00
NaCl (Sigma)	0.20
L-Cisteína (Sigma)	0.10
Ácido ascórbico (Sigma)	0.02
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	0.06
K ₂ HPO ₄ (Sigma)	0.10
Citrato férrico de amonio (Sigma)	0.00228

Se disolvieron todos los componentes en 50 ml de agua tridestilada. Se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 10 N y se aforó a 100 ml. Se distribuyó en alicuotas de 10 ml en tubos de cultivo de 15 x 175 mm con tapón de rosca, se esterilizaron a 15 lb/pulg² por 15 min y se almacenaron a -20°C hasta el momento de usarlos. Antes de sembrar los trofozoitos, a cada tubo se le agregó 1 ml de suero de bovino adulto y 0.1 ml de mezcla de antibióticos.

NOTA: Cada experimento se realizó por duplicado, por lo menos 3 veces.

4. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS.

Los tubos de cultivo se colocaron en un baño de agua-hielo por 30 min para despegar las células adheridas a la superficie; se resuspendieron por agitación de los tubos; se tomó una alícuota para colocarla en una cámara de Neubauer y se contaron las células totales.

Para calcular el rendimiento de quistes se cosecharon los trofozoítos y quistes por enfriamiento y posterior agitación. Se hizo un recuento de células totales y después se sometieron a centrifugación a 1 200 rpm para eliminar el medio; posteriormente se agregaron 3 ml de Trítón X-100 (Sigma) al 0.25% diluido en agua destilada y se incubó durante 3 min para luego agitar 1 seg en vórtex. Se colocó una muestra en la cámara de Neubauer y se contaron las células que resistieron la acción del detergente, para calcular el porcentaje de quistes que había en la muestra original, tomando como el 100% al total de quistes más trofozoítos obtenido del primer recuento celular.

5. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO.

En una serie de tubos de 17 x 150 mm, con tapón de rosca, los cuales contenían 10 ml de medio TYI-S-33 y mezcla de antibióticos, se inocularon 2×10^4 trofozoítos. Los tubos se incubaron a 25°C y cada 24 horas, durante 12 días se hizo un conteo de células en una cámara de Neubauer de cada par de tubos, para calcular el promedio de células. Se graficó el número de células contra el tiempo de crecimiento.

6. EFECTO DE AGENTES ESTIMULADORES DE LA ADENILIL CICLASA SOBRE EL CRECIMIENTO.

Se hicieron cinéticas de crecimiento de trofozoítos de *E. invadens*, sembrando en tubos de 17 x 150 mm inoculando 2×10^4 células por ml de medio TYI-S-33, al cual se le agregó L-epinefrina o hidroxitiramina (dopamina) a concentraciones de 0.1 y 0.01 mM o bien, NaF (Sigma) a concentraciones de 0.5, 1.0, 2.5, 3.0, 5.0 y 10.0 mM en sendos pares de tubos. Cada 72 horas se contaron las células por duplicado y con estos datos se trazaron curvas dosis-respuesta, graficando el rendimiento de células hasta los 12 días de incubación.

7. EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA DEL AMP_c SOBRE EL CRECIMIENTO.

Se hicieron cinéticas de crecimiento de trofozoítos de *E. invadens* sembrando en una serie de tubos 2×10^4 células por ml en medio TYI-S-33, al cual se le agregó cafeína o teofilina a concentraciones de 0.5, 1, 2.5 y 10 mM. Cada 72 horas se contaron las células por duplicado y se hicieron curvas dosis-respuesta, graficando el rendimiento hasta los 12 días de incubación.

8. MÉTODO DE ENQUISTAMIENTO CON ALTA TENSIÓN DE CO₂ (Morales-Vallarta y col, 1997).

En tubos de vidrio de 17 x 150 mm con 10 ml de medio TYI-S-33 se inocularon 2×10^4 células por ml de medio. Se burbujeó CO₂ con un flujo aproximado de 2 l por minuto durante 2 minutos, utilizando una pipeta Pasteur con filtro de algodón. Se incubaron los tubos a 25°C durante 4 días, al cabo de los cuales se sustituyó el medio por TYI-S-33 sin glucosa. Nuevamente se burbujeó CO₂ durante 2 min y se incubaron

por otros 4 días más a 25°C. Todos los procedimientos se realizaron en forma estéril en una campana de flujo laminar VACCO.

9. EFECTO DE AGENTES ESTIMULADORES DE LA ADENILIL CICLASA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE *E. invadens*.

Se utilizó el método de enquistamiento por el método de alta tensión de CO₂. Al momento de sustituir el medio por TYI-S-33 sin glucosa, se agregó la droga cuyo efecto se quería probar: L-epinefrina, dopamina o NaF a diferentes dosis, como se mencionó en el procedimiento anterior. Después de 4 días de incubación en presencia de la droga, se hizo el recuento de células totales (trofozoítos y quistes) y el cálculo del porcentaje de enquistamiento, después de tratar la muestra con Tritón X-100 al 0.25 % como se indica en la sección 4.

10. EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA DEL AMPc SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE *E. invadens*.

Se utilizó el método de enquistamiento por el método de alta tensión de CO₂ como se describió anteriormente. Al sustituir el medio por TYI-S-33 sin glucosa, se agregó cafeína o teofilina. Después de 4 días de incubación en presencia de la droga a 25°C (a menos que se especifique algo diferente), se hizo el recuento de células totales (trofozoítos más quistes), y el cálculo del porcentaje de enquistamiento después de tratar la muestra con Tritón X-100 como se indica en la sección 4.

11. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA DETERMINAR CONCENTRACIÓN DE AMPc EN TROFOZOITOS.

Se sembraron 2×10^4 trofozoitos de *E. invadens* por ml en frascos spinner con 1200 ml de medio TYI-S-33 (Said-Fernández y col, 1992), solo o en presencia de cafeína 1 mM o NaF 2.5 mM y se incubaron a 25°C por 2 a 12 días. Después se cosecharon las amibas por enfriamiento y centrifugación a 700g. Posteriormente se hizo un recuento total de células y luego se lisaron agregando un volumen de solución hipotónica de Tris base (Sigma) 10 mM, EDTA (Sigma) 1.54 mM, glucosa (Sigma) 20 mM y NaCl (Sigma) 0.137 mM (Frank, 1972). Estas muestras se guardaron a -20°C hasta el momento de ser procesadas.

12. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA DETERMINAR CONCENTRACIÓN DE AMPc EN QUISTES.

El enquistamiento se indujo por el método de alta tensión de CO₂. Después de esto se cosecharon los quistes, los cuales fueron tratados con Tritón-X100 al 0.25% por 15 min. Posteriormente, los quistes fueron lavados con agua destilada y se guardaron a -20°C hasta el momento de ser procesados. Para determinar los niveles de AMPc se descongelaron los quistes y se contaron en cámara de Neubauer; se colocaron en un tubo de ensaye en baño de hielo, para luego ser lisados en un sonicador Ultrasonic Homogenizer Cole Parmer Instrument Co., Chicago, ILL S4710, durante 2.5 min con 50 U de control de salida y una frecuencia de 80 ciclos/seg.

13. CUANTIFICACIÓN DEL AMPc.

Los niveles de AMPc se determinaron por el método descrito por Gilman (1970), el cual se basa en una competencia entre el AMPc celular y el AMPc radiactivo (exógeno) por una proteína con alta afinidad por AMPc. Se agregó una cantidad fija de

[³H]AMPc a las muestras a las cuales se quería determinar la concentración de AMPc celular. Al agregar la muestra radiactiva, el AMPc celular compite con el AMPc marcado, por adherirse a la proteína de alta afinidad por el AMPc; el AMPc previamente unido es desplazado debido a que se establece un equilibrio de disociación. Luego que se establece el equilibrio, el AMPc disociado, tanto marcado como no marcado, fue eliminado utilizando carbón activado. Por centrifugación se recuperaron en el sobrenadante los complejos proteína-AMPc, los cuales se colocaron en un vial con 5 ml de líquido de centelleo Biodegradable Counting Scintillant (Amersham), para luego detectar las c.p.m. en un contador de radiactividad Perkin Elmer Mod. Tri carb 1 600 TR, Packard A, Canberra. Se calculó de manera indirecta la concentración de AMPc celular, tomando como base una curva estándar en la cual se utilizaron cantidades conocidas de AMPc no marcado.

Se utilizó un Kit de Amersham (TM), procediendo de la siguiente manera: los lisados de quistes y trofozoítos, obtenidos para determinar la concentración de AMPc y se colocaron en baño de agua en ebullición durante 3 min, con el fin de precipitar las proteínas. Después de centrifugar, se recuperó el sobrenadante para luego procesarlas.

En tubos eppendorff se colocaron las muestras que se procesaron por duplicado. A los tubos 1, 2, 3 y 4 (tubos blanco de AMPc) no se les adicionó AMPc estándar; a estos tubos se les agregó solución amortiguadora de Tris 4 mM, EDTA 1.54 mM y glucosa 20 mM, incluido en el Kit.. A los tubos marcados con los números del 5 al 14 se les agregó una solución estándar de AMPc no marcado, ajustando el volumen para que cada par de tubos contuvieran 1, 2, 4, 8 ó 16 pmol de AMPc. Estos tubos fueron utilizados para construir la curva estándar de concentración conocida de AMPc. Al resto de los tubos se les agregaron las muestras del lisado de quistes o de trofozoítos; todas las muestras se procesaron por duplicado. A todos los tubos se les agregaron 20

μl de $[^3\text{H}]\text{AMPc}$. Enseguida, a todos, exceptuando los tubos 1 y 2, se les agregó 100 μl de proteína de alta afinidad por el AMPc (extraída de músculo de bovino). A los tubos 1 y 2 se les adicionó la solución amortiguadora de Tris-EDTA-glucosa. Los tubos se agitaron 5 seg en un vórtex y se incubaron a 4°C durante 2 horas, para permitir que se estableciera el equilibrio de disociación, al cabo de las cuales se agregaron 100 μl de la suspensión de carbón activado, para después centrifugar 2 min a 10 000 rpm. Del sobrenadante se tomaron 150 μl y se colocaron en viales con 5 ml de solución de centelleo, para después hacer las lecturas en el contador de radiactividad.

14. TINCIÓN DE HOECHST.

Se preparó una solución concentrada disolviendo 0.01 g de Reactivo de Hoechst 33258 Sigma Chemical Co. (Gicquaud y Tremblay, 1991) en 100 ml de agua bidestilada. Se hicieron alícuotas de 100 μl y se guardaron a -20°C hasta el momento de usarlos. Para preparar la solución de trabajo, a cada 100 μl de esta preparación, se le agregaron 4.9 ml de agua bidestilada. A la pastilla de quistes, aproximadamente 2 millones, se le agregaron 50 μl de la solución de Hoechst y se incubaron a temperatura ambiente y al abrigo de la luz durante 30 min. La muestra fue observada en microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot, con fuente de luz ultravioleta.

RESULTADOS

I. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *E. invadens*.

La cinética de crecimiento de *E. invadens* se muestra en la Fig 1, en la cual se puede observar que el máximo de la fase logarítmica de crecimiento se alcanzó a los 9 y 10 días de incubación, con un rendimiento final de 3.3×10^5 células por ml y un tiempo de duplicación de aproximadamente 48 horas. La cinética de crecimiento fue muy semejante en su pendiente y en rendimiento a las obtenidas con trofozoítos de la misma cepa *in vitro*, reportados en trabajos anteriores (Portillo, 1992).

II. EFECTO DE INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA DEL AMPc SOBRE EL CRECIMIENTO DE *E. invadens*.

A) EFECTO DE LA CAFEÍNA.

Considerando que la cafeína y la teofilina inhiben la acción catalítica de la fosfodiesterasa del AMPc, se esperaría que como efecto de la acción de estos agentes, se aumentara el nivel intracelular de AMPc y que este incremento tuviera algún efecto sobre el crecimiento de *E. invadens*. Con el propósito de saber cuál sería dicho efecto, se inocularon cinco series de tubos que contenían medio TYI-S-33, con 2×10^4 trofozoítos por ml, adicionados con cafeína a concentraciones finales de 1, 2, 3 y 5 mM y se incubaron a 25°C. Los resultados mostraron que la cafeína tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. invadens*, el cual fue dependiente de la dosis de la droga, observándose una disminución de 34, 57, 84 y 90 % respectivamente en el rendimiento final de células a los 12 días de cultivo, con respecto al testigo (Fig 2).

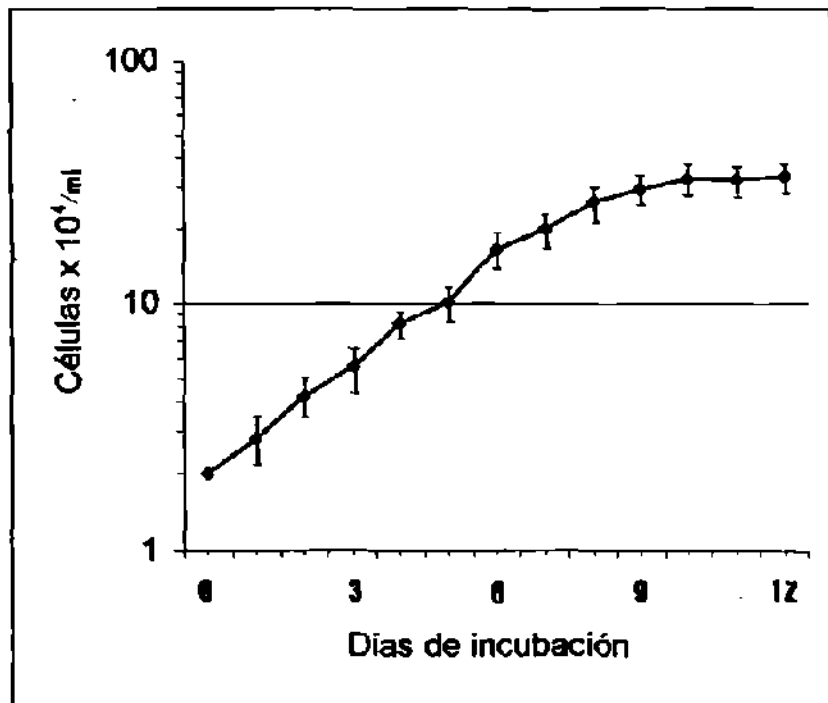


Fig. 1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *E. invadens*. Se sembraron 2×10^4 trofozoítos/ml en una serie de tubos con 10 ml de medio TYI-S-33. Se incubaron a 25°C y cada 24 horas se realizó el conteo de células. El experimento se realizó 3 veces por duplicado.

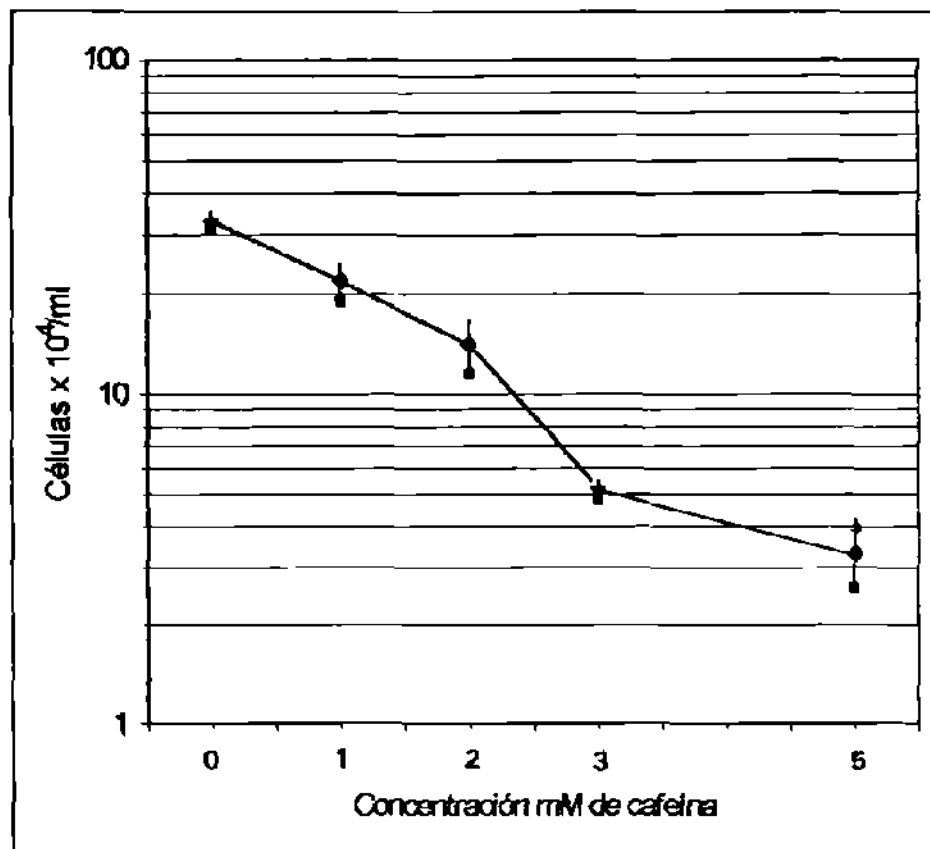


Fig 2. EFECTO DE LA CAFEÍNA SOBRE EL RENDIMIENTO DE *E. invadens* A LOS 12 DÍAS EN CULTIVO. Se sembraron 2×10^4 trofozoitos/ml en una serie de tubos de cultivo con tapón de rosca con 10 ml de medio TYI-S-33. A cada uno se le adicionó cafeína 1, 2, 3 o 5 mM. Un quinto par se utilizó como testigo. Todos los tubos se incubaron a 25°C y se contaron las células a los 12 días.

B) EFECTO DE LA TEOFILINA.

Para probar el efecto de la teofilina sobre el crecimiento de *E. invadens* como agente inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc, se realizó un nuevo experimento, observando las mismas condiciones. Como resultado de esta serie de experimentos, pudimos observar que la teofilina tuvo también un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las amibas y al igual que cuando se usó cafeína, este efecto fue dependiente de la dosis de la droga. Por lo tanto, el rendimiento final a los 12 días de cultivo se vio disminuido en un promedio de 29, 42.2, 80 y 88.2 % respectivamente con las dosis de 1, 2, 3 y 5 mM, de manera directa a la concentración con respecto al testigo (Fig 3).

III. EFECTO DE AGENTES ESTIMULADORES DE LA ADENILIL CICLASA SOBRE EL CRECIMIENTO DE *E. invadens*.

Al utilizar agentes que estimulan la acción de la adenilil ciclase, se espera que aumenten los niveles intracelulares de AMPc. Hasta la fecha se desconoce si *E. invadens* posee en su membrana, receptores para estimuladores de la adenilil ciclase tales como la L-epinefrina ó 2 hidroxitiramina (dopamina). Sin embargo, son agentes que en otros sistemas celulares aumentan los niveles de AMPc, por lo cual decidimos probar el efecto de estos agentes sobre el crecimiento de los trofozoítos de *E. invadens*. Para ello se sembraron 2×10^4 trofozoítos por ml en una serie de tubos con tapón de rosca conteniendo 10 ml de medio TYI-S-33, adicionado de L-epinefrina 10^{-4} o 10^{-5} mM; dopamina 10^{-4} o 10^{-5} o bien, NaF 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 mM.

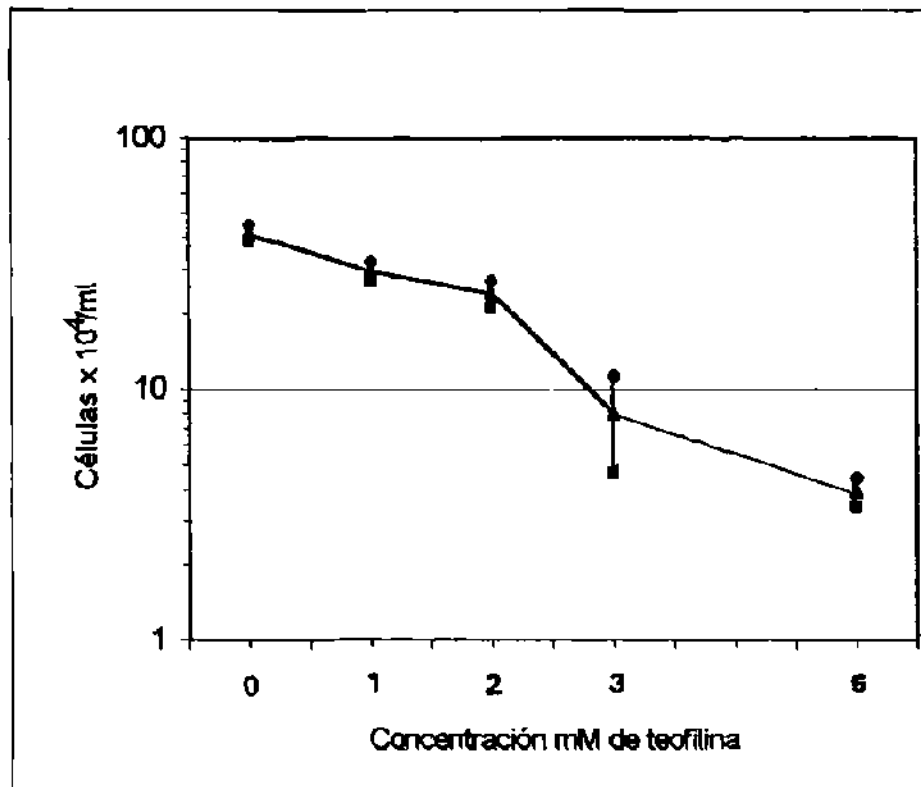


Fig. 3. EFECTO DE LA TEOFILINA SOBRE EL RENDIMIENTO DE *E. invadens* A LOS 12 DÍAS EN CULTIVO. Se sembraron 2×10^4 trofozoítos/ml en una serie de tubos con medio TYI-S-33. A cada par de tubos se le adicionó teofilina 1, 2, 3 y 5 mM. Un quinto par se utilizó como testigo. Todos los tubos se incubaron a 25°C y se contaron las células a los 12 días.

Se hicieron cinéticas de crecimiento y se observó que L-epinefrina y dopamina no tuvieron efecto alguno sobre el crecimiento de *E. invadens*. Por lo tanto, sus rendimientos se mantuvieron como el testigo (Figs 4 y 5). Sin embargo, el NaF, agente que estimula la adenilil ciclasa sin la participación de la proteína G, sí tuvo efecto sobre el crecimiento. También en este caso se observó que el efecto fue dependiente de la concentración de la droga. Así, una concentración 1 mM retardó el crecimiento en los primeros días, pero no el rendimiento final a los 12 días en cultivo. En cambio, la concentración 2.5 mM inhibió el crecimiento en un promedio de 12%, mientras que dosis mayores inhibieron el crecimiento de manera directa a la dosis agregada, ya que a una concentración de 3mM, el crecimiento fue inhibido en un 65%, mientras que una concentración 5.0 mM lo inhibió un 87% (Fig 6).

IV. EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ESTIMULADORES DE LA ADENILIL CICLASA E INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA DEL AMPc SOBRE EL CRECIMIENTO DE *E. invadens*.

Ya que tanto los agentes estimuladores de la adenilil ciclasa como los inhibidores de la fosfodiesterasa del AMPc inhibieron el crecimiento de *E. invadens*, se decidió probar el efecto de la combinación de ambos tipos de agentes sobre el crecimiento de dicha cepa. Para ello se hicieron cultivos en medio TYI-S-33. A una serie de tubos se le agregaron soluciones concentradas para obtener una concentración final de 1 mM más NaF 2.5 mM; en otra serie se agregaron las mismas drogas a concentración final de 1 mM y 3.0 mM respectivamente. Además se sembraron una serie de tubos a los que se les agregó cafeína 1 mM o NaF 2.5 mM o 3.0 mM; a una última serie no se le agregó droga alguna (testigo).

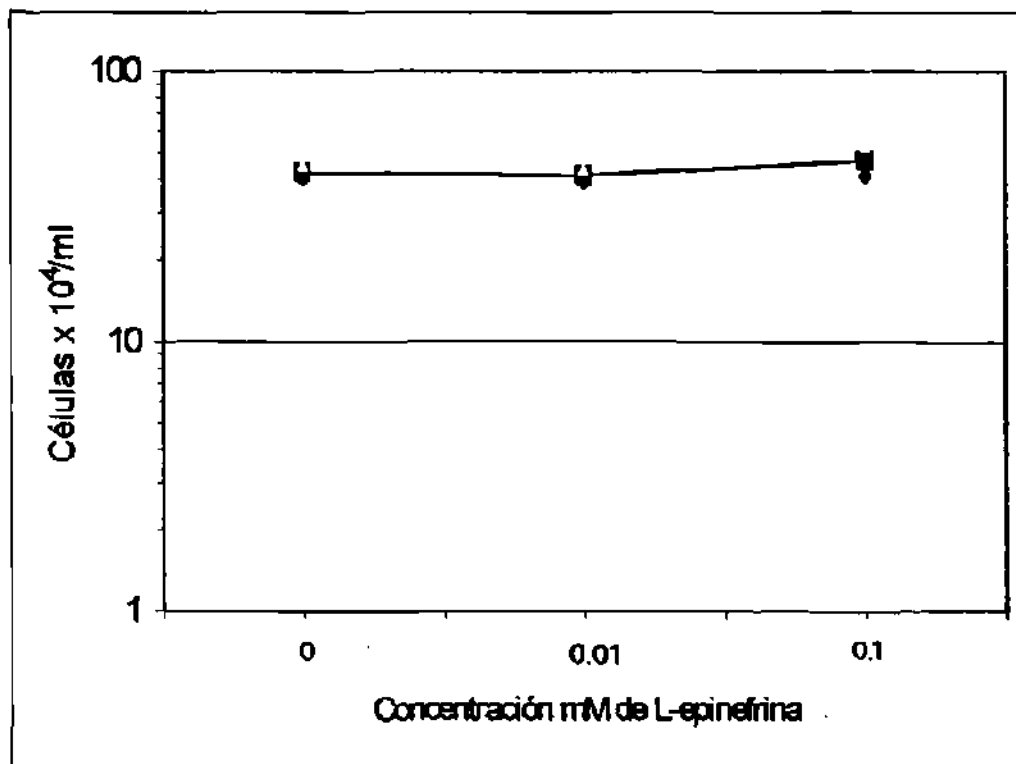


Fig 4. EFECTO DE LA L-EPINEFRINA SOBRE EL RENDIMIENTO DE *E. invadens* A LOS 12 DÍAS EN CULTIVO. Se sembraron 2×10^4 trofozoitos/ml en una serie de tubos con 10 ml de medio TYI-S-33. A un par de tubos se le adicionó L-epinefrina 10^{-5} M y a otro par, dopamina 10^{-4} M. Un tercer par fue usado como testigo. Se incubaron todos a 25°C por 12 días, al cabo de los cuales se hizo el conteo de células.

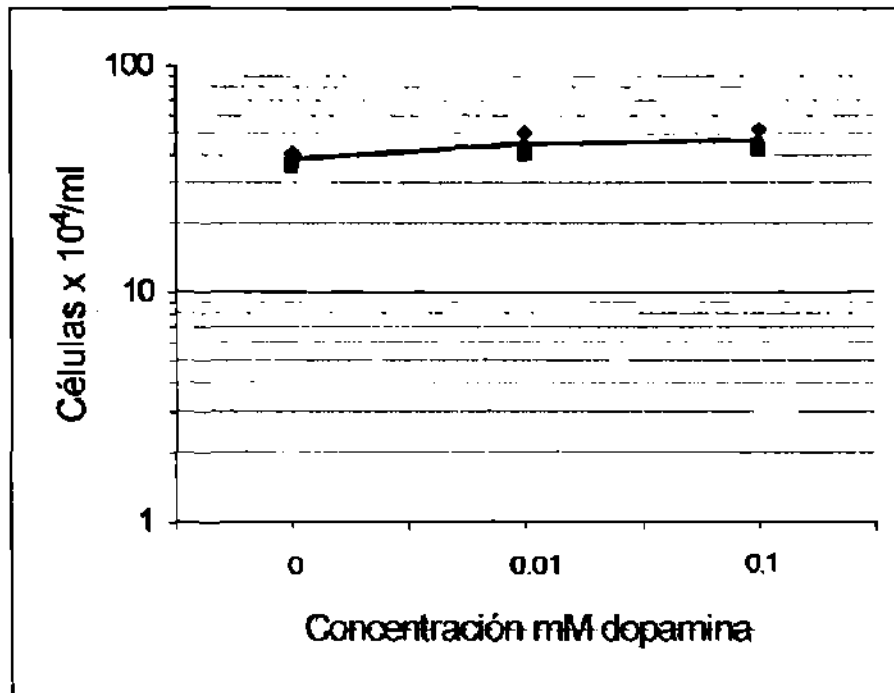


Fig 5. EFECTO DE LA DOPAMINA SOBRE EL RENDIMIENTO DE *E. invadens* A LOS 12 DÍAS EN CULTIVO. Se sembraron 2×10^4 trofozoítos/ml en una serie de tubos con medio TYI-S-33. A un par de tubos se le adicionó dopamina 10^{-5} M y a otro par, dopamina 10^{-4} M. Un tercer par fue usado como testigo. Se incubaron todos a 25°C por 12 días, al cabo de los cuales se hizo el conteo de células.

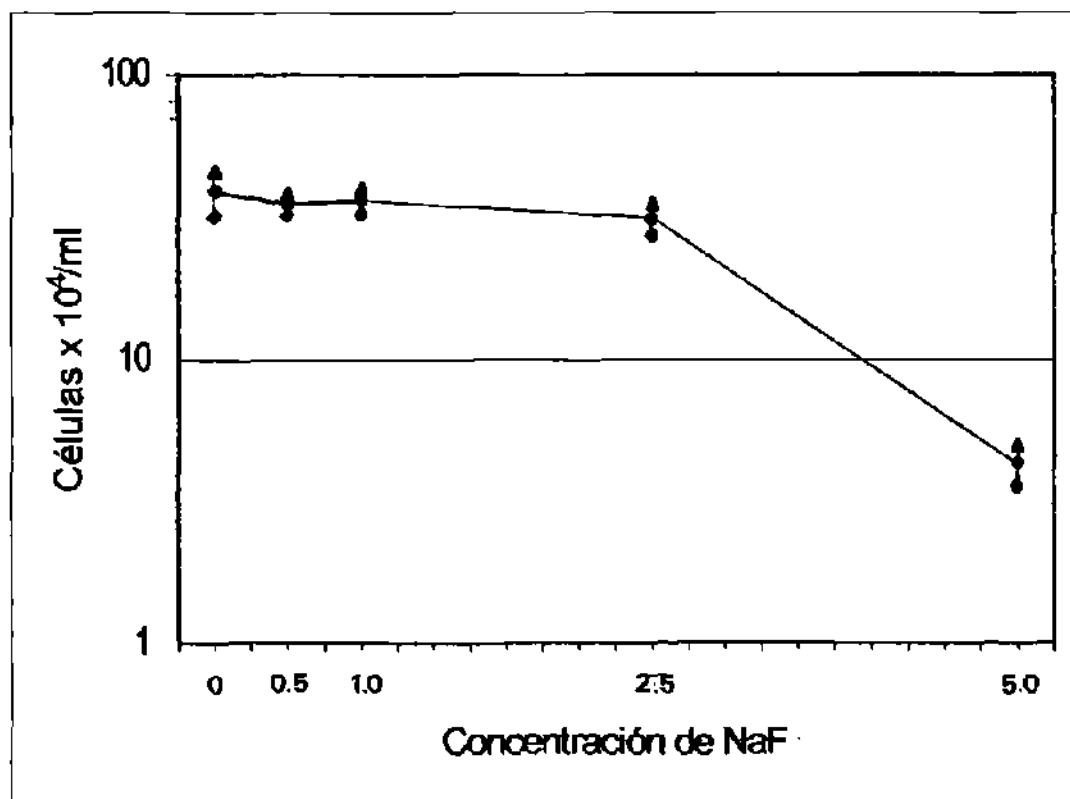


Fig. 6. EFECTO DEL NaF SOBRE EL RENDIMIENTO DE *E. invadens* A LOS 12 DÍAS EN CULTIVO. Se sembraron 2×10^4 trofozoítos/ml en tubos con medio TYI-S-33. A un par de tubos se le adicionó dopamina a concentración 0.5, 1.0, 2.5 ó 5.0 mM. Un par fue usado como testigo. Se incubaron a 25°C y se hizo el conteo de células a los 12 días.

Los resultados se muestran en la Fig 7. Observamos que cada una de las drogas solas, a las dosis más bajas (cafeína 1 mM (tratamiento 4) y NaF 2.5 mM (tratamiento 2) inhibieron respectivamente un 34 y un 43 % el crecimiento a los 12 días en cultivo, ya que el rendimiento final fue de 31 ± 4 y $26.5 \pm 5 \times 10^4$ células/ml respectivamente. La inhibición del crecimiento debida a la presencia de la combinación de cafeína 1 mM más NaF 3 mM (tratamiento 6) fue de un 73 %, que fue muy semejante al efecto observado cuando los trofozoítos fueron incubados en presencia de NaF a concentración final de 3 mM, sin cafeína (tratamiento 3), ya que el rendimiento final fue de $9.3 \pm 0.6 \times 10^4$ células/ml, es decir que hubo una inhibición de 75% en el crecimiento con respecto al testigo.

V. EFECTO DE INHIBIDORES DE LA FOSFODISTERASA DEL AMPc SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE *E. invadens*, CEPA IP-1.

La cafeína y la teofilina inhiben la acción catalítica de la fosfodiesterasa del AMPc; ya que se ha reportado que dichas drogas inhiben el crecimiento y promueven la diferenciación de *T. cruzi*, *T. lewisi* y *H. culbertsoni*, decidimos probar el efecto de estas drogas sobre la diferenciación de *E. invadens*.

A) EFECTO DE TEOFILINA 3 mM SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*.

Se cultivaron trofozoítos con suero de bovino adulto que fue esterilizado con 1.5 Mrad con radiación γ ; se agregó teofilina hasta ajustar a una concentración final de 3 mM al momento de sustituir el medio por TYI-S-33 sin glucosa, es decir, en la segunda fase del método de enquistamiento. Los resultados obtenidos mostraron que la droga

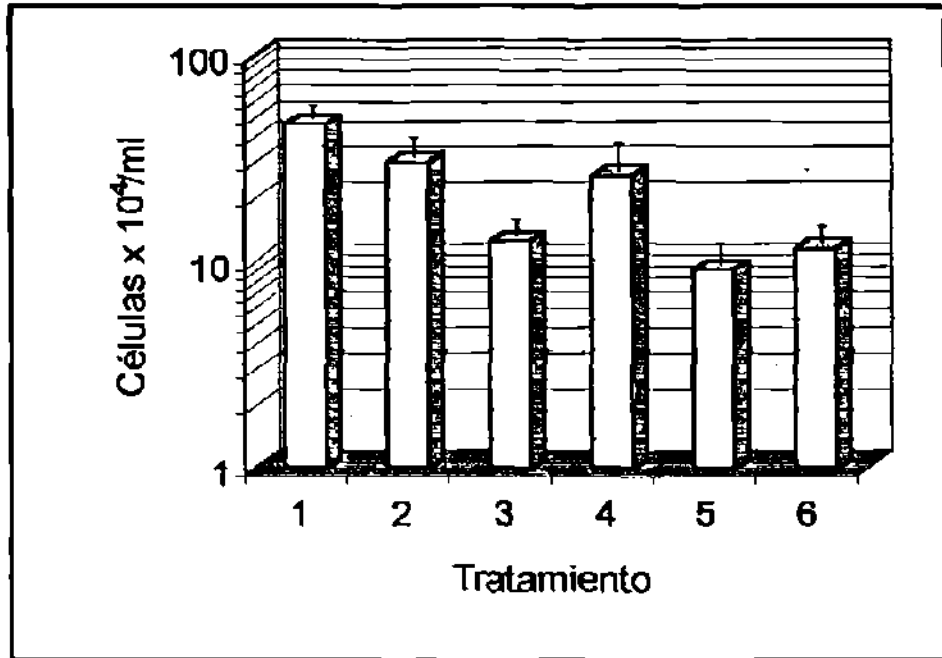


Fig 7. EFECTO DEL NaF MAS CAFEÍNA SOBRE EL RENDIMIENTO DE *E. Invadens* A LOS 12 DÍAS EN CULTIVO. Se sembraron 2×10^4 trofozoitos/ml en 6 series de tubos con medio TYI-S-33: Tratamiento 1: Testigo; tratamiento 2: se le agregó NaF 2.5 mM; el tratamiento 3 fue la adición de NaF 3 mM; tratamiento 4, cafeína 1 mM; tratamiento 5, cafeína 1 mM+ NaF 2.5 mM y tratamiento 6, cafeína 1 mM + NaF 3 mM. Para calcular el rendimiento se procedió como se describe en Materiales y Métodos.

a esta dosis inhibió en aproximadamente un 93% el enquistamiento con respecto a los tubos testigo (Fig 8).

B) EFECTO DE CAFEÍNA 3 mM

También se probó el efecto de la cafeína siguiendo el mismo procedimiento, agregando cafeína a una concentración final de 3 mM en la segunda fase del método de enquistamiento. Se observó que esta droga tuvo un efecto muy similar al mostrado por la teofilina, ya que el enquistamiento fue inhibido en aproximadamente 90% con respecto a los tubos testigo (Fig 8).

C) EFECTO DE DOSIS BAJAS DE CAFEÍNA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE *E. invadens*.

Se probó el efecto de la cafeína sobre el enquistamiento de *E. invadens*, agregando cafeína a concentraciones finales de 0.3, 0.7 y 1.0 mM. Los resultados obtenidos mostraron que el efecto inhibitorio sobre el enquistamiento es dependiente de la dosis de la droga, ya que cuando la concentración de ésta era de 0.3 mM inhibió un 35%; la concentración 0.7 mM, un 50% y la de 1.0 mM inhibió el enquistamiento en un 89% con respecto al rendimiento de quistes obtenido en los tubos testigo. El rendimiento de quistes fue de 47%, 36% y 7.7% en las concentraciones respectivas, mientras que en los tubos testigos fue de 72% en promedio (Fig 9).

D) EFECTO DE CAFEÍNA Y TEOFILINA 1.5 Mm SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE *E. invadens*.

Ya que la inhibición observada a una dosis de cafeína 1.0 mM fue considerable, se decidió probar una dosis un poco mayor que ésta, con el propósito de asegurar que

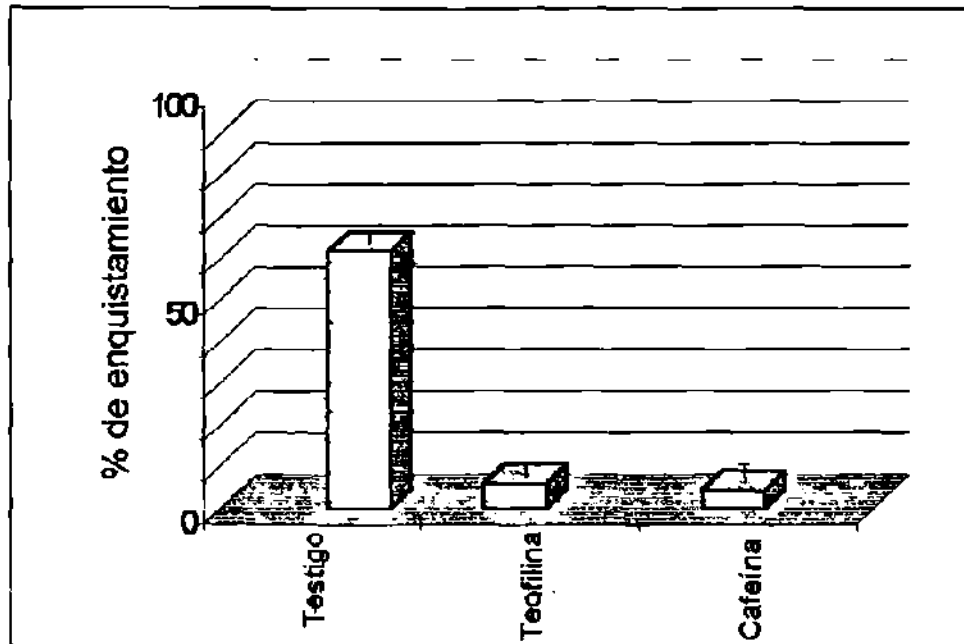


Fig 8. EFECTO DE LA TEOFILINA 3 mM Y LA CAFEÍNA 3 mM SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*. Se sembraron 2×10^4 trofozoitos/ml en tubos con medio TYI-S-33. Se burbujeó CO_2 durante 2 min y se incubaron 4 días a 25°C . Se indujo el enquistamiento por alta tensión de CO_2 en presencia de cafeína o teofilina 3 mM. Se incubó a 25°C por 4 días, al cabo de los cuales se calculó el % de quistes.

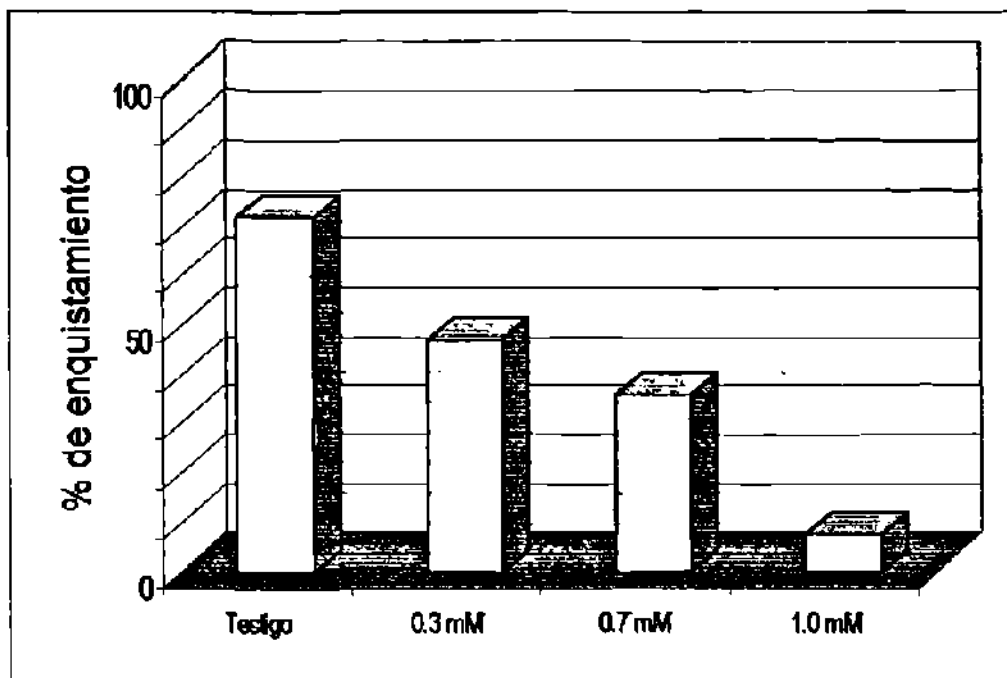


Fig 9. EFECTO DE DOSIS BAJAS DE CAFEÍNA SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*. Se sembraron 2×10^4 trofozoitos en tubos con 10 ml de medio TYI-S-33; se indujo el enquistamiento por el método de alta tensión de CO_2 en presencia de cafeína 0.3, 0.7 y 1.0 mM. Se incubaron a 25°C por 4 días y se calculó el % de quistes. Se realizó sólo un experimento por duplicado.

en los experimentos posteriores se observara dicho efecto inhibitorio sobre el enquistamiento cuando así se requiriera.

Se realizó un nuevo experimento similar a los descritos anteriormente, en el cual se agregó solución de cafeína o de teofilina 1.5 mM al momento de sustituir el medio por TYI-S-3 sin glucosa. Los resultados obtenidos fueron inesperado, ya que ninguna de las dos drogas a esta concentración, tuvieron efecto alguno sobre la diferenciación de las amibas (Fig 10). El rendimiento de quistes fue menor en aproximadamente 30% en presencia de la droga con respecto a los tubos testigo, cuyo rendimiento fue de 71 ± 3 %. Sin embargo, la morfología y movilidad de los trfozoitos era aparentemente normal (Fig 11). En vista de que los resultados observados con la cafeína y con la teofilina fueron muy similares, decidimos utilizar en los experimentos posteriores, solamente cafeína como agente inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc.

Con el propósito de corroborar los resultados anteriores (Figs 10 y 11), se repitieron los experimentos en los cuales se utilizaron las dosis de cafeína 0.3, 0.7, 1.0, 1.5 y 3.0 mM. En esta ocasión pudimos observar que además de que la inhibición que se esperaba como efecto de la presencia de la droga fue mucho menor de lo que se había observado, este proceso se llevó a cabo en un lapso de aproximadamente 20 horas después de que se sustituyó el medio por TYI-S-33 sin glucosa y no a las 96 horas, como había ocurrido en los experimentos anteriores. Este enquistamiento rápido también fue observado en los tubos testigo, es decir, en aquéllos a los que no se les había adicionado droga alguna.

El porcentaje de enquistamiento obtenido en presencia de cafeína 0.3 mM fue de $65 \pm 4.5\%$; a concentración 0.7 mM fue de $57 \pm 3.3\%$; con cafeína 1.0 mM fue de $59.7 \pm 5.1\%$; a concentración 1.5 mM fue de $41 \pm 6.5\%$ y a concentración 3.0 mM, el rendimiento de quistes fue de $44.8 \pm 3.3\%$ (Fig 12).

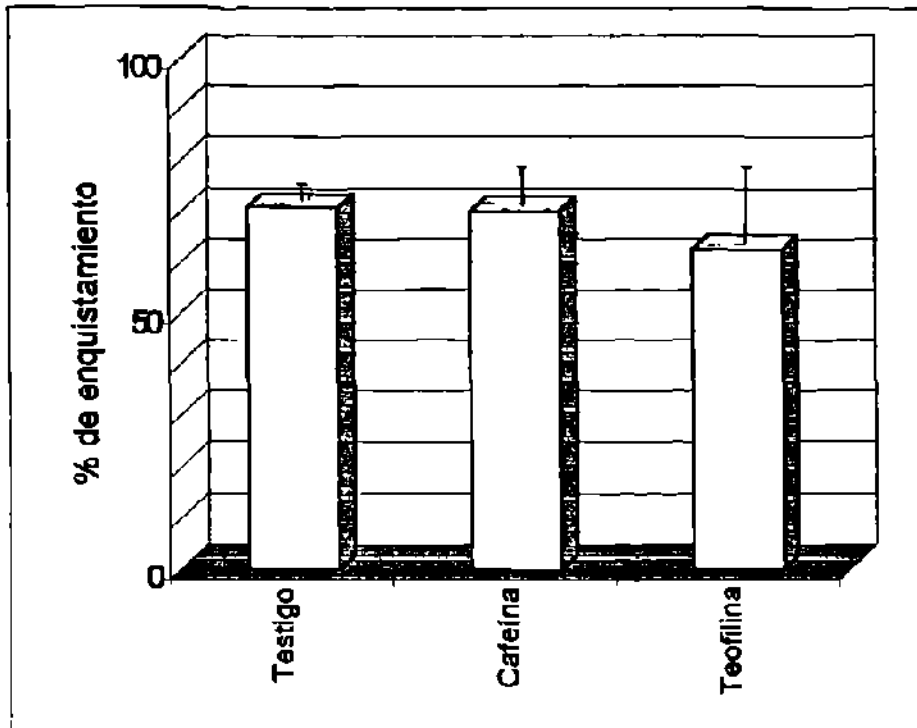


Fig 10. EFECTO DE CAFEÍNA 1.5 mM Y TEOFILINA 1.5 mM SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*. Se sembraron 2×10^4 trofozoitos/ml en tubos con medio TYI-S-33- Se indujo el enquistamiento por el método de alta tensión de CO_2 en presencia de cafeína o de teofilina 1.5 mM. Después de incubar a $25^\circ C$ por 4 días, se calculó el % de quistes.

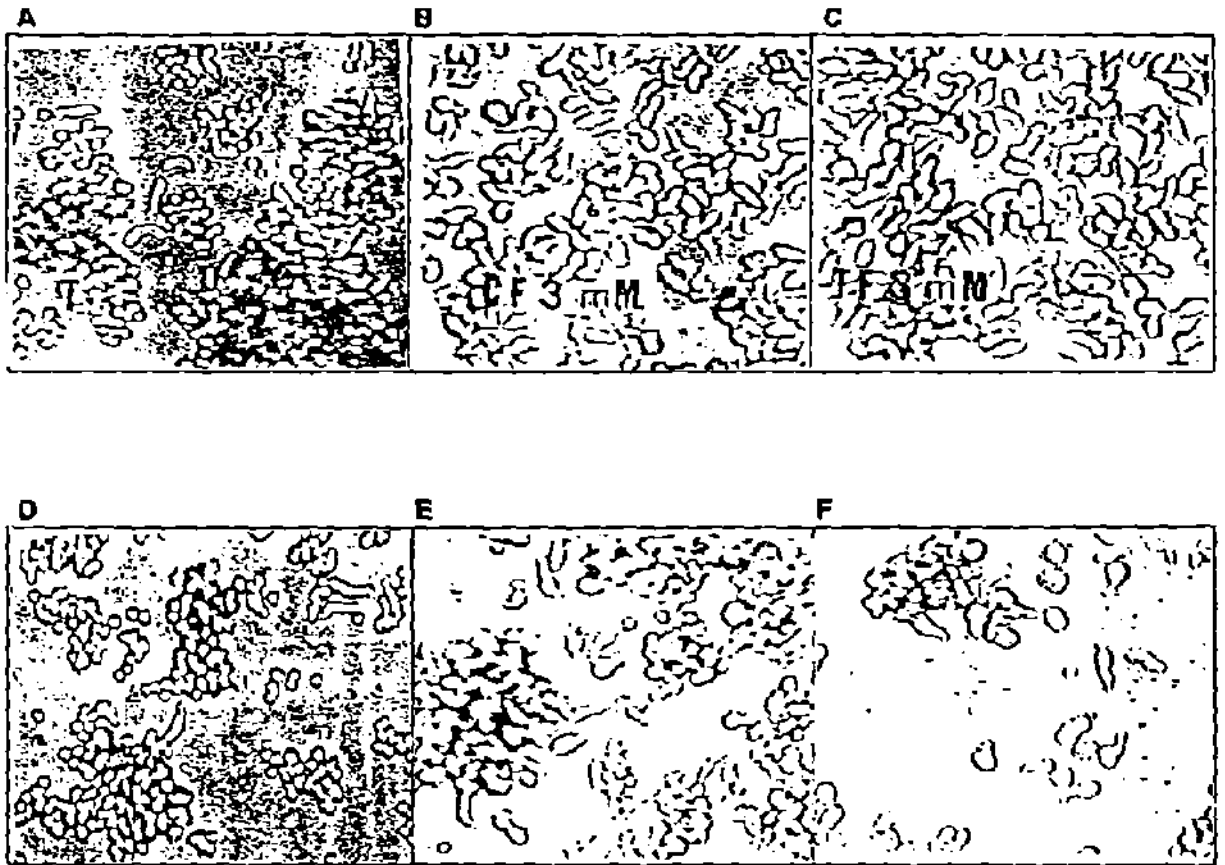


Fig. 11. EFECTO DE CAFEÍNA Y TEOFILINA SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*. Se sembraron 2×10^4 trofozoitos/ml en tubos con medio TYI-S-33. Se indujo el enquistamiento por el método de alta tensión de CO_2 en presencia de cafeína 3 mM (B) o 1.5 mM (E); teofilina 3 mM (C) o 1.5 mM (F). Se observó que a concentración 3 mM, ambas drogas inhibieron el enquistamiento. A y D son los testigos.

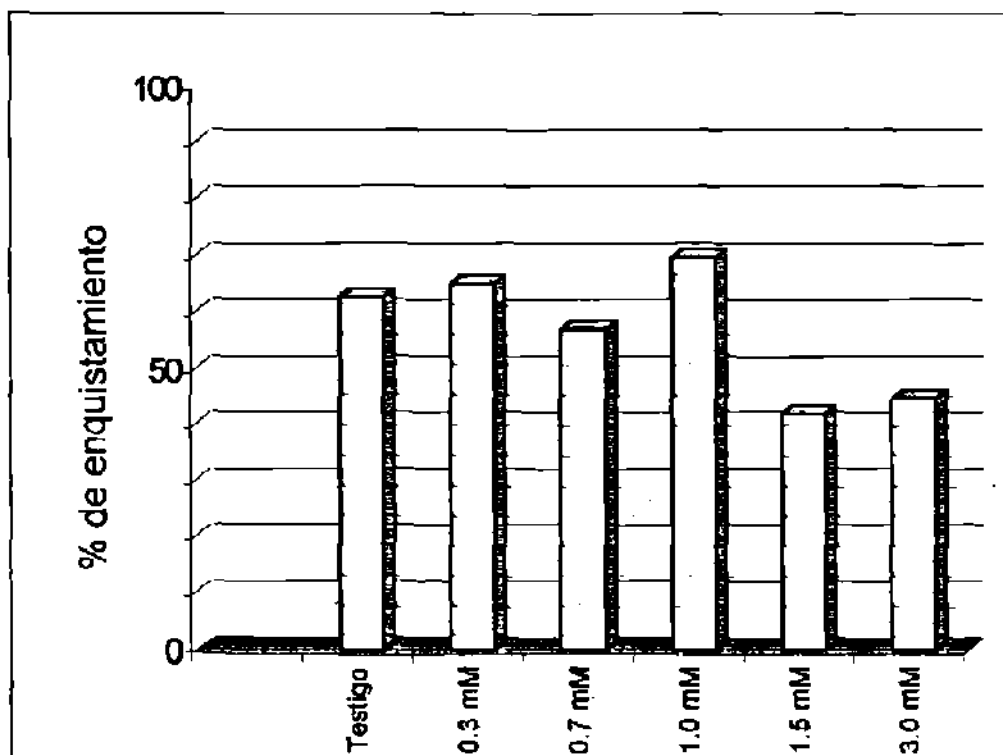


Fig 12. EFECTO DE LA CAFEÍNA SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*. Se sembraron 2×10^4 trofozoítos/ml en tubos con medio TYI-S-33. Se indujo el enquistamiento por el método de alta tensión de CO_2 en presencia de cafeína 0.3, 0.7, 1.0, 1.5 y 3 mM. Después de incubar a $25^\circ C$, se calculó el % de quistes. En este caso, el enquistamiento ocurrió a las 20 horas de haber sustituido el medio por TYI-S-33 sin glucosa.

No hubo diferencia significativa entre el rendimiento de quistes en ausencia ($62.6 \pm 3.3\%$) o en presencia de la droga a las concentraciones 0.3, 0.7 ó 1.0 mM. La inhibición del enquistamiento observada en presencia de cafeína 3.0 mM y 1.5 mM no resultó ser como esperábamos, ya que anteriormente habíamos observado que a concentración de 3 mM de cafeína y de teofilina, la inhibición era casi total, mientras que a concentración 1.5 mM no había inhibición. Sin embargo, en estos experimentos, a concentraciones de 1.5 o 3 mM, hubo una inhibición de aproximadamente el 30% con respecto a los testigos. Lo anterior nos obligó a probar el efecto de dosis mayores de la droga sobre el enquistamiento con el fin de determinar cuál era la concentración que produciría un efecto inhibitorio sobre dicho proceso. Por lo tanto, se indujo el enquistamiento en presencia de cafeína a concentraciones de 1, 3, 5 y 10 mM, ya que seguiríamos utilizando el mismo lote de suero esterilizado por radiación para complementar el medio de cultivo.

El porcentaje de enquistamiento en presencia de cafeína 1.0 mM fue de $60 \pm 4.5\%$; con cafeína 3.0 mM, el rendimiento de quistes fue de $67 \pm 13.5\%$; a una concentración de 5 mM el rendimiento fue de $17 \pm 4.8\%$ y en presencia de cafeína 10.0 mM, fue de $3.0 \pm 2\%$ (Fig 13).

Los resultados irregulares que se obtuvieron con respecto al efecto de las distintas concentraciones de cafeína sobre el enquistamiento de *E. invadens*, pensamos que podrían ser debidas a la presencia o ausencia de un sedimento que se forma en el suero esterilizado por radiación. Por tal motivo, después se realizó un experimento para determinar el efecto que podría tener sobre el enquistamiento, el material precipitado que se forma en el suero esterilizado por radiación.

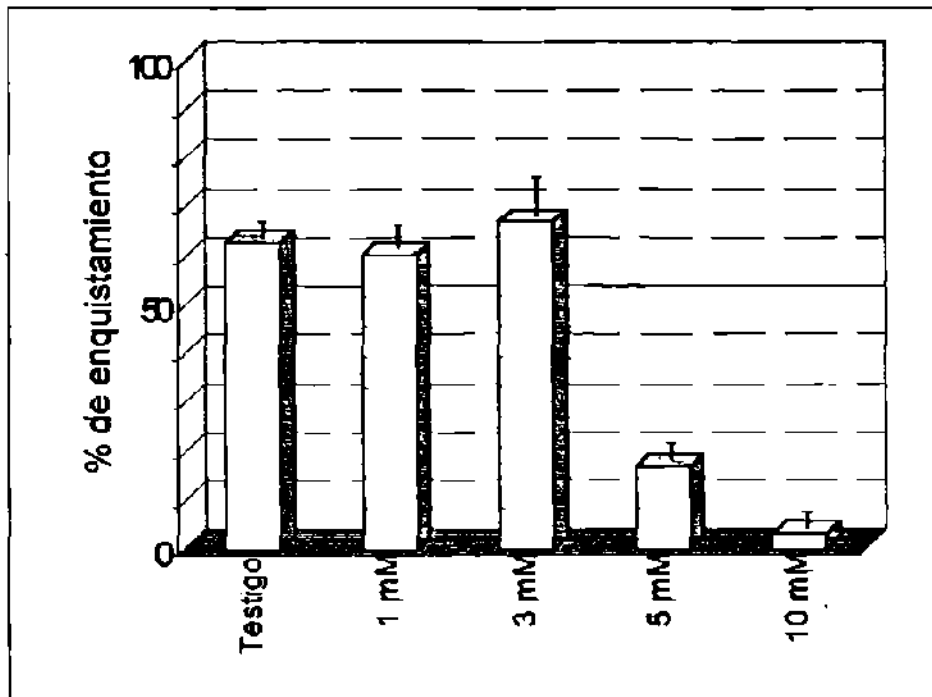


Fig 13. EFECTO DE DOSIS ALTAS DE CAFEÍNA SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*. Se sembraron 2×10^4 trofozoítos/ml en tubos con medio TYI-S-33 y se indujo el enquistamiento por el método de alta tensión de CO_2 en presencia de cafeína 1, 3 5 y 10 mM. Después de incubar 4 días a 25°C , se hizo el conteo de quistes.

E) EFECTO DEL MATERIAL PRECIPITABLE DEL SUERO BOVINO ESTERILIZADO POR IRRADIACIÓN SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE *E. invadens*.

Con el objeto de probar si la presencia del material precipitable presente en el suero bovino esterilizado por irradiación era lo que anulaba el efecto inhibitorio que se había observado en experimentos anteriores incluso a concentraciones menores de 1.0 mM de cafeína, se indujo el enquistamiento en presencia de cafeína 10.0 mM, utilizando el lote de suero esterilizado por radiación. A un par de tubos se le agregó suero sin sedimento (eliminado por centrifugación), mientras que a otro par de tubos se le agregó el suero con parte del material sedimentado, evitando alterar el volumen de suero agregado al medio. El rendimiento de quistes obtenido en el tubo al que se le agregó el sedimento fue de 41% mientras que el obtenido con el suero sin sedimento, el rendimiento de quistes fue de 3.9% (Fig 14).

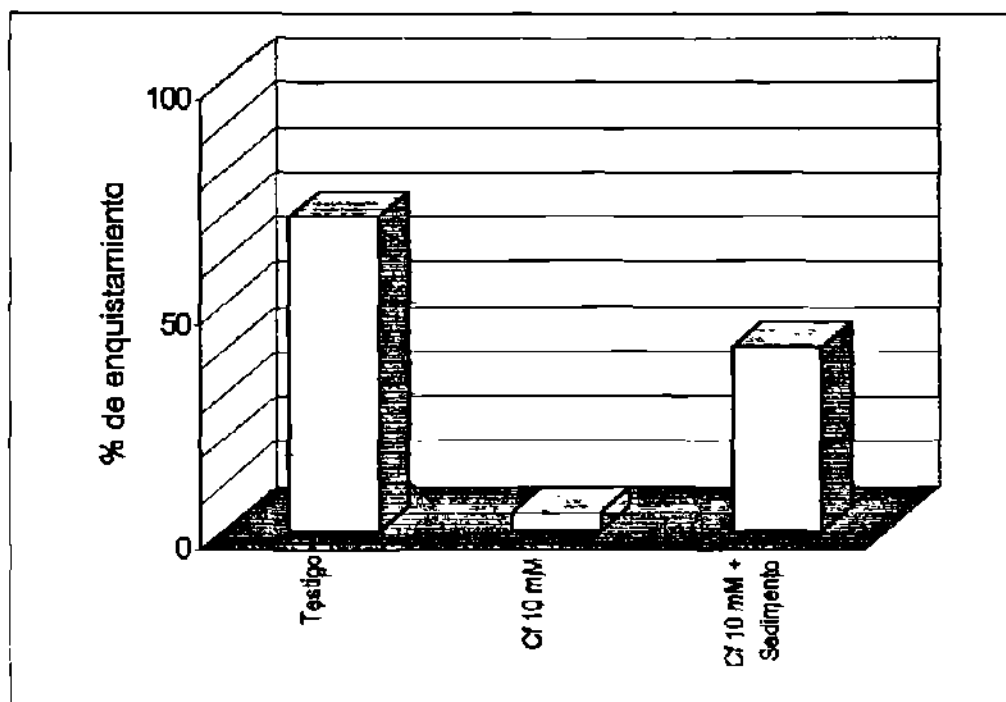


Fig 14. EFECTO DEL SEDIMENTO DEL SUERO ESTERILIZADO POR RADIACIÓN SOBRE EL EFECTO INHIBITORIO DE LA CAFEÍNA 10 mM EN LA DIFERENCIACIÓN DE *E. invadens*. Se sembraron 2×10^4 trofozoitos/ml en medio TYI-S-33 y se indujo el enquistamiento por el método de alta tensión de CO_2 en presencia de cafeína 10 mM. A un par de tubos se le agregó suero irradiado con sedimento y a otro, suero irradiado sin sedimento. Después de incubar 4 días a 25°C , se calculó el % de quistes. El experimento se hizo una vez por duplicado.

VI. EFECTO DE ESTIMULADORES DE LA ADENILIL CICLASA SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*.

A) EFECTO DE LA L-EPINEFRINA.

Hasta la fecha no se ha reportado si el género *Entamoeba* posee receptores de membrana para L-epinefrina o para 2-hidroxitiramina (dopamina), agentes que en células eucariotas superiores y en algunos organismos unicelulares estimulan la actividad de la adenilil ciclase. Como se mencionó anteriormente, los agentes estimuladores de la adenilil ciclase elevan los niveles de AMPc dentro de la célula; estos niveles altos de AMPc tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de algunas células de eucariotes superiores *in vitro* y promueven la diferenciación en eucariotes inferiores.

Para probar si los estimuladores de la adenilil ciclase tienen algún efecto sobre la diferenciación de *E. invadens*, se indujo el enquistamiento como se describió en Materiales y Métodos, agregando L-epinefrina al momento de sustituir el medio por TYI-S-33 sin glucosa.

El rendimiento de quistes en presencia de L-epinefrina a una concentración final de 10^{-5} M fue de 66.7 ± 12.5 %, mientras que el rendimiento de quistes cuando la concentración de la hormona fue de 10^{-4} M, el rendimiento fue de 67 ± 11.8 %. Los porcentajes de enquistamiento en presencia de la hormona fueron muy semejantes a los obtenidos en los tubos testigo, cuyo rendimiento fue de 65 ± 7.7 %, no habiendo diferencia significativa entre ellos (Fig 15).

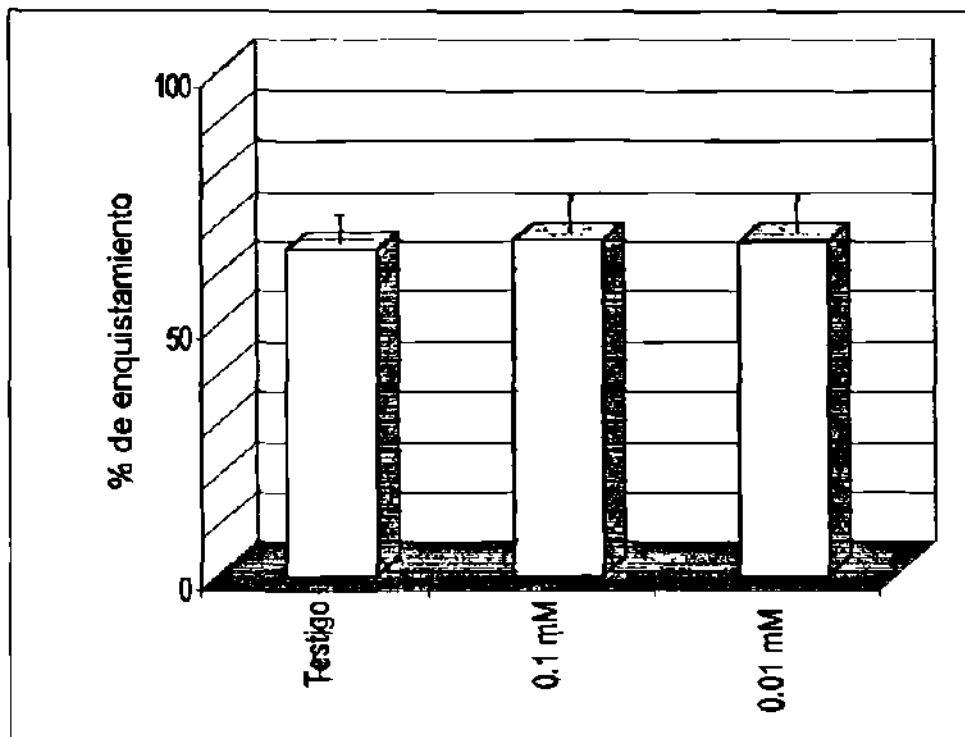


Fig 15. EFECTO DE LA L-EPINEFRINA SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*. Se sembraron 2×10^4 trofozoitos/ml en tubos con medio TYI-S-33 y se indujo el enquistamiento por el método de alta tensión de CO_2 en presencia de L-epinefrina 10^{-4} y 10^{-5} M. Después de incubar 4 días a 25°C , se hizo el conteo de quistes.

B) EFECTO DE LA DOPAMINA SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*.

Se realizó un experimento siguiendo el mismo protocolo que para el experimento en el que se utilizó L-epinefrina, sólo que en lugar de esta hormona se utilizó dopamina, la cual fue agregada a concentraciones de 10^{-4} y 10^{-5} M en la segunda fase del método de enquistamiento ya descrito. El rendimiento de quistes en presencia de dopamina a concentración de 10^{-5} M fue de $60.7 \pm 12\%$, mientras que en presencia de este compuesto a concentración de 10^{-4} M, el rendimiento de quistes fue de $76 \pm 8.7\%$. Nuevamente observamos que no hubo diferencia significativa entre el rendimiento de quistes obtenido en presencia de la hormona con respecto al testigo, cuyo rendimiento de quistes fue de $76.3 \pm 13\%$ (Fig 16).

C) EFECTO DEL NaF SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*.

Ya que el NaF mostró un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. invadens*, pensamos que también podría tener algún efecto sobre la diferenciación de este parásito. Con el propósito de demostrarlo, se indujo el enquistamiento como se describió en Materiales y Métodos, agregando NaF 0.5, 1.0, 2.5 y 5 mM al momento de sustituir el medio por TYI-S-33 sin glucosa.

El rendimiento de quistes en presencia de NaF 0.5 mM fue de $46.5 \pm 10.5\%$; cuando la concentración fue 1.0 mM, el rendimiento de quistes fue de $64 \pm 12.5\%$; en presencia de NaF 2.5 mM el rendimiento fue de $26.2 \pm 5.1\%$ y a concentración 5 mM el rendimiento de quistes fue de 0. La inhibición producida por el NaF 0.5 mM (aproximadamente el 33%) fue mayor que la producida por el NaF 1.0 mM (aproximadamente 13 %) con respecto al testigo, cuyo rendimiento de quistes fue de $73.3 \pm 9\%$ (Fig 17).

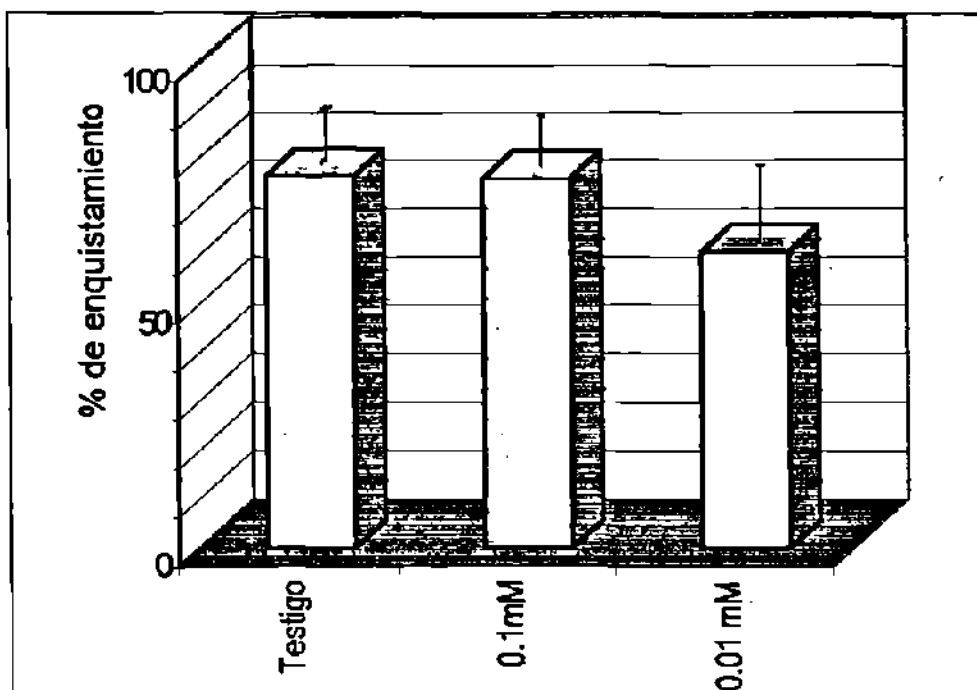


Fig 16. EFECTO DE LA DOPAMINA SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*. Se sembraron 2×10^4 trofozoitos/ml en tubos con medio TYI-S-33 y se indujo el enquistamiento por el método de alta tensión de CO_2 en presencia de dopamina 10^{-4} y 10^{-5} M. Después de incubar a 25°C se calculó el % de quistes.

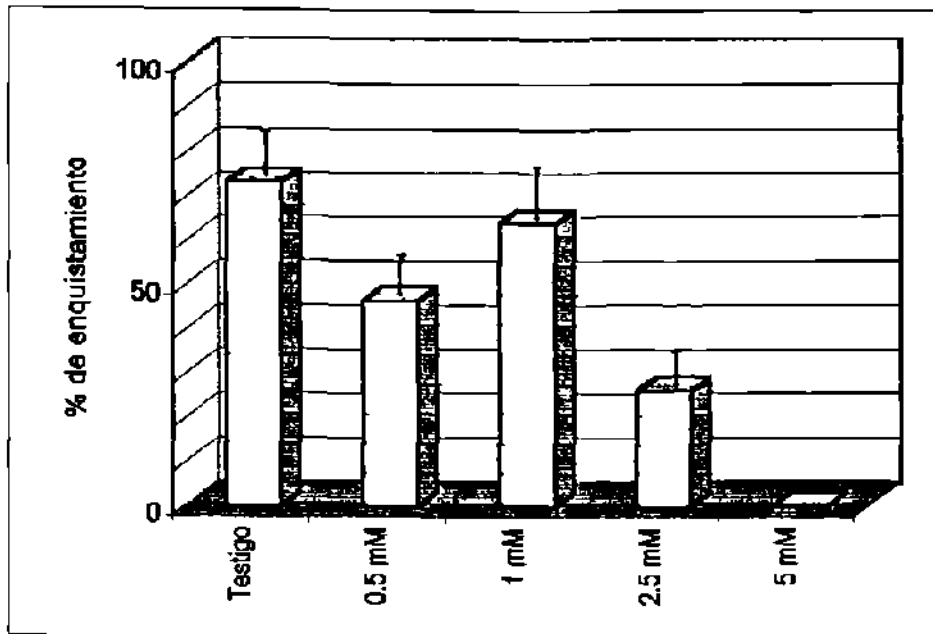


Fig 17. EFECTO DEL NaF SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*. Se sembraron 2×10^4 trofozoitos/ml en tubos con medio TYI-S-33 y se indujo el enquistamiento por el método de alta tensión de CO_2 en presencia de NaF 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 mM. Después de incubar a 25°C se calculó el % de quistes.

VII. EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ESTIMULADORES DE LA ADENILIL CICLASA E INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA DEL AMPc SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*.

Ya que tanto los agentes estimuladores de la adenilil ciclasa (NaF), así como los inhibidores de la fosfodiesterasa del AMPc probados inhibieron el enquistamiento de *E. invadens*, se decidió probar el efecto de la combinación de ambos tipos de agentes sobre el enquistamiento. Para ello se hicieron cultivos en medio TYI-S-33 siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Al momento de sustituir el medio por TYI-S-33 sin glucosa se agregaron a una serie de tubos, cafeína más NaF a concentraciones finales de 3 mM y 0.5 mM respectivamente; a otra serie se agregaron las mismas drogas a concentración final de cafeína 3 mM más NaF 1.0 mM y una tercera serie con cafeína 5 mM más NaF 1.0 mM.

El rendimiento de quistes fue de $19.5 \pm 4.2\%$ en los tubos que tenían cafeína 3 mM + NaF 0.5 mM; en los que tenían cafeína 3 mM + NaF 1.0 mM, el rendimiento de quistes fue de $18 \pm 2.9\%$ y en aquéllos que contenían cafeína 5 mM + NaF 1.0 mM, el rendimiento de quistes fue de $14.3 \pm 2.5\%$ (fig 18).

VIII. OBSERVACIÓN CON TINCIÓN DE HOECHST.

La tinción del DNA con Hoechst 33258 nos permitió la observación del material genético de los quistes de *E. invadens*, por microscopia de fluorescencia. Se incubaron los quistes con Hoechst 33258 como se describió en Materiales y Métodos y se observó que la mayoría de los quistes inducidos en presencia de NaF o de cafeína presentaban un solo núcleo y en otros se detectó fluorescencia deslocalizada en la periferia del quiste. En cambio, en los quistes testigo, pudieron observarse hasta 8 núcleos enfocando en diferentes planos. En todas las muestras hubo quistes cuyo núcleo no fue detectado por este método (Fig 19).

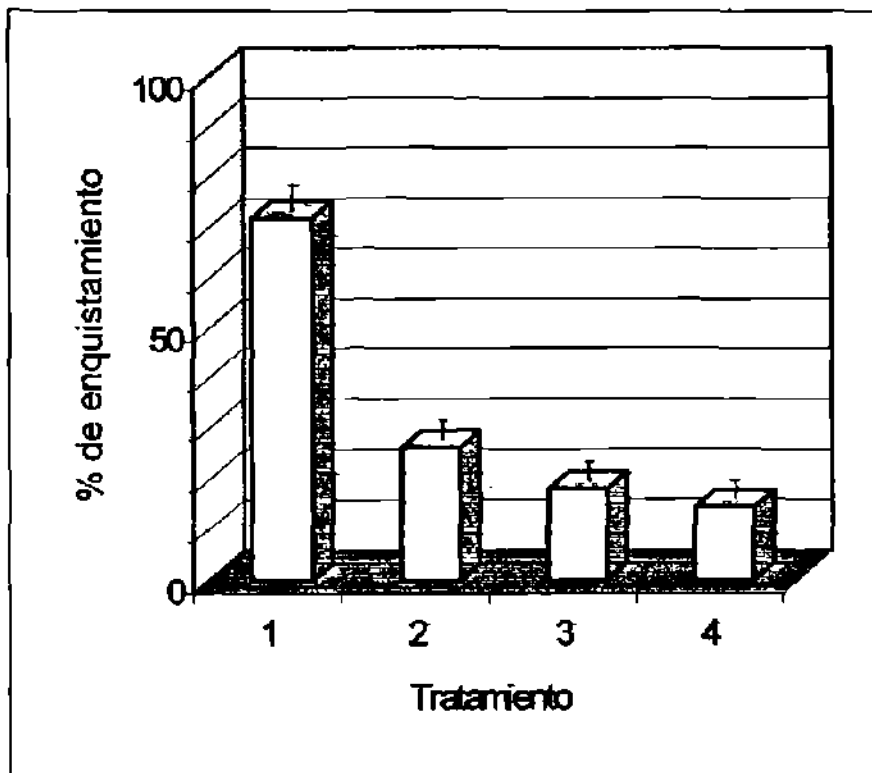


Fig 18. EFECTO DE NaF + CAFEÍNA SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *E. invadens*. El procedimiento del ensayo se realizó como se indica en Materiales y Métodos. El tratamiento 1 son los tubos testigo; el tratamiento 2, cafeína 3 mM + NaF 0.5 mM; el tratamiento 3, -cafeína 3 mM + NaF 1 mM y el tratamiento 4, cafeína 5 mM + NaF 1 mM.

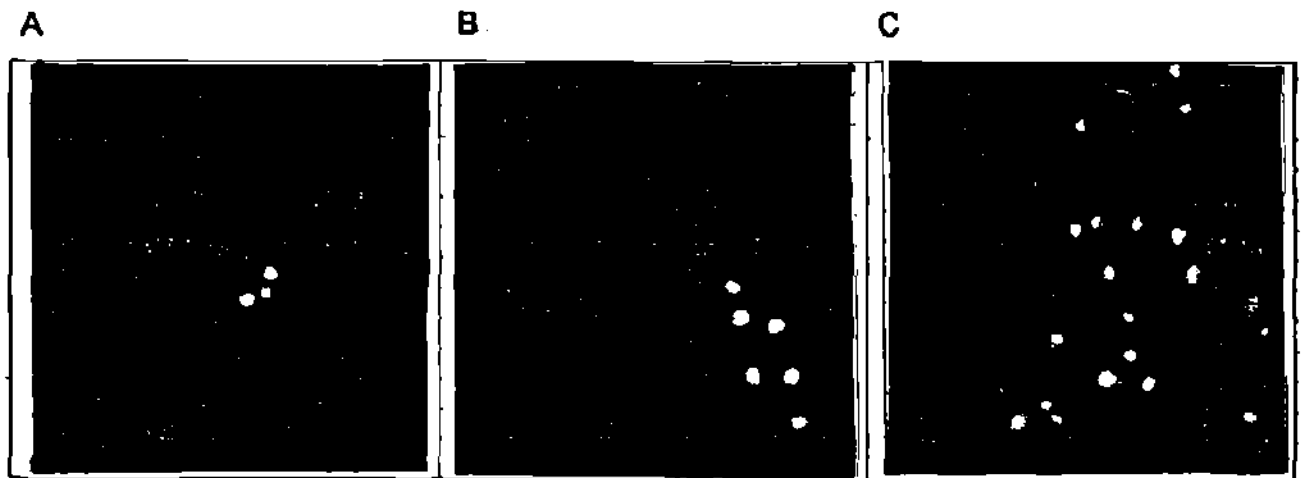


Fig 19. QUISTES DE *E. invadens* TENIDOS CON REACTIVO DE HOESCHT. Se indujo el enquistamiento de *E. invadens* por el método de alta tensión de CO₂. Se cosecharon los quistes y se incubaron con Hoescht 33258 como se describió en Materiales y Métodos y se observaron en microscopio de fluorescencia. A: quistes testigo; B: quistes inducidos en presencia de cafeina 5 mM. C: quistes inducidos en presencia de NaF 2.5 mM. En A se observa un quiste con 4 núcleos bien definidos; en B se observan 6 quistes y un núcleo bien definido en cada uno; en C se observa la mayoría de quistes con un solo núcleo y algo de fluorescencia en la periferia.

IX. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMPc EN TROFOZOITOS DE *E. invadens*.

Se hicieron cultivos masivos de trofozoitos de *E. invadens* cepa IP-1 en medio TYI-S-33 para determinar la concentración de AMPc en presencia de cafeína y de NaF. Ya que se requería un gran número de trofozoitos, se utilizaron las concentraciones de 1 mM y 2.5 mM respectivamente de cada droga, las cuales, como ya se había observado en experimentos anteriores, inhiben el crecimiento pero no de manera considerable.

Después de transcurrido el tiempo de incubación (2, 6 ó 12 días), se cosecharon los trofozoitos por enfriamiento y centrifugación; se contaron y se lisaron con una solución hipotónica de Tris-EDTA-glucosa-NaCl. Antes de ser procesados estos lisados, se colocaron en baño de agua en ebullición durante 3 min, con el fin de precipitar las proteínas y eliminarlas después de centrifugar.

A todos los tubos que contenían 50 μ l del lisado celular se les agregaron 50 μ l de [3 H]AMPc y después 100 μ l de proteína con alta afinidad por el AMPc. De esta manera se incubó para establecer el equilibrio de asociación entre el AMPc celular (no marcado) y el AMPc exógeno (marcado), de tal forma que conforme se incrementa el AMPc celular, la proporción del AMPc marcado unido a la proteína de afinidad disminuye y por lo tanto, se detecta menor reactividad con respecto a aquéllas con baja concentración de AMPc celular. El exceso de AMPc se eliminó agregando carbón activado y sedimentando por centrifugación.

Para determinar la concentración de AMPc en cada muestra, se construyó una curva estándar utilizando soluciones estándares de AMPc frío a concentraciones conocidas de 1, 2, 4 y 8 pmol, contenidos en 50 μ l de solución amortiguadora. Se calculó el promedio de cpm de los 2 viales que contenían sólo AMPc marcado (AMPc celular = 0) y se le restó el promedio de las lecturas de los 2 tubos blanco, a los cuales

no se les había agregado la proteína enlazante. Al resultado de esta resta se le llamó C_0 .

$$C_0 = \text{cpm } [^3\text{H}]\text{AMPc} - \text{cpm tubos blanco.}$$

Sustituyendo los valores obtenidos, teníamos:

$$C_0 = 2\ 836 - 324 = 2\ 512.$$

A cada una de las demás muestras se le restó la lectura de cpm del blanco y al resultado se le llamó C_x .

Con las lecturas obtenidas de la curva estándar (C_x) se calculó C_0/C_x y se graficó este valor contra la concentración de AMPc de cada muestra, con lo cual se obtuvo una recta cuya ecuación es:

$$y = 0.9393 (x) + 0.6727$$

El coeficiente de correlación fue de 0.99 y la $m = 0.9393$ (Fig 20).

Las lecturas obtenidas para las muestras problema se muestran en la Tabla I.

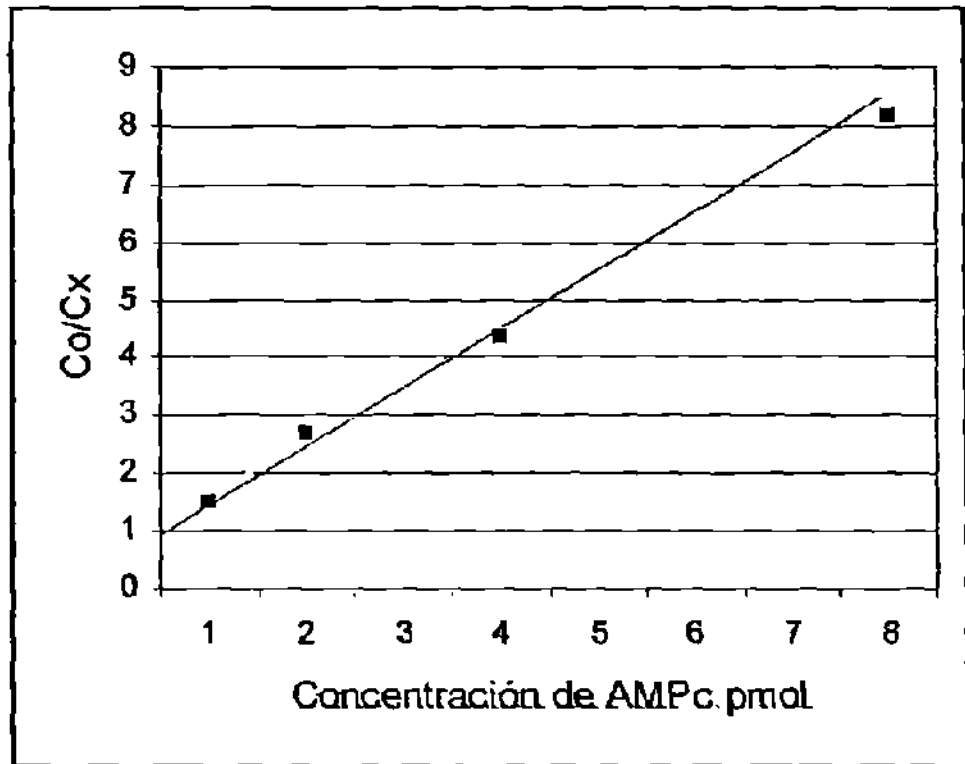


Fig 20. CURVA ESTÁNDAR PARA CALCULAR CONCENTRACIÓN DE AMPc. En una serie de tubos se colocaron 1, 2, 4 u 8 pmol de AMPc estándar y se procesaron como se describe en Materiales y Métodos. Después de hechas las lecturas en el contador de centelleo, se calculó Co/Cx para cada uno de los tubos y se graficó contra la concentración de AMPc. La ecuación de la recta fue $y = 0.9393(x) + 0.6727$.

TABLA I. Promedio de las cpm detectadas en trofozoitos de *E. invadens* incubados en presencia de cafeína 1 mM y de NaF 2.5 mM.

TROFOZOITOS	DÍAS DE INCUBACIÓN	CPM
Testigo	2	5 018 ± 9
	6	5 032 ± 240
	12	4 282 ± 780
Cafeína 1 mM	2	5 092 ± 188
	6	5 422 ± 66
	12	5 210 ± 8
NaF 2.5 mM	2	5 138 ± 210
	6	5 417 ± 180

Como se puede observar, las lecturas obtenidas indican que estas muestras tenían mucho AMPc marcado. Esto quiere decir que las concentraciones de AMPc celular deberían ser muy bajas. Sin embargo, debido a que C_0 (lectura en ausencia de AMPc no marcado) fue igual a 2 512, teóricamente cualquier muestra debería dar lectura menor o cuando mucho igual que C_0 ; por lo tanto, para descartar la posibilidad de haber utilizado viales que estuvieran contaminados, se repitió el experimento, pero esta vez, antes de agregar la muestra, se verificaron en el contador los viales que contenían el líquido de centelleo. Las lecturas obtenidas fueron igual o muy cercanas a 0, por lo que se continuó con el procedimiento, colocando las muestras en los viales. Esta vez el valor calculado para $C_0 = 3 036$ y las lecturas obtenidas se presentan en la Tabla II.

TABLA II. Radiactividad detectada en muestras de trofozoitos de *E. invadens* incubados en presencia de cafeína 1 mM o de NaF 2.5 mM.

TROFOZOITOS	DÍAS DE INCUBACIÓN	CPM
Testigo	2	5 568 ± 430
	6	5 637 ± 71
	12	6 451 ± 645
Cafeína 1 mM	2	5 301 ± 121
	6	5 524 ± 11
		5 121 ± 296
NaF 2.5 mM	2	5 138 ± 210
	6	5 590 ± 200
	12	5 301 ± 121

Al igual que en el experimento anterior, las lecturas corresponderían teóricamente a niveles de AMPc menores de 0. Ante tal situación, se decidió hacer un nuevo experimento incluyendo una serie de tubos a los cuales no se les agregó la proteína de alta afinidad por el AMPc, ya que en ausencia de ésta, teóricamente no debería captarse AMPc marcado. De esta manera se detectaría algún factor ajeno al Kit, el cual tuviera afinidad por el AMPc. Las lecturas obtenidas de estos tubos sin proteína de afinidad se muestran en la Tabla III.

TABLA III. Radiactividad detectada en muestras de trofozoitos de *E. invadens*, por el método de Gilman, a las cuales no se les agregó proteína de alta afinidad por el AMPc.

TROFOZOÍTOS	DÍAS DE INCUBACIÓN	CPM
Testigo	2	4 667
	6	4 239
	12	4 002
Cafeína 1 mM	2	2 742
	6	3 511
	12	4 462
NaF 2.5 mM	2	3 654
	6	4 345
	12	3 928

Con estos resultados se corrigieron restando la lectura obtenida para cada muestra en ausencia de la proteína enlazante (Ca) al total de cpm en presencia de dicha proteína (Cm). De esta forma se calculó:

$$CX = Cm - Ca, \quad \text{para luego calcular } Co/Cx.$$

Posteriormente se determinó el promedio de Co/Cx , para después definir la concentración de AMPc utilizando la recta obtenida de las soluciones estándar, como la que se muestra en la Fig 20. Luego se calculó la concentración de AMPc en pmol por célula, tomando en cuenta el número de células que son equivalentes a los 50 μ l de la muestra original. Como los valores obtenidos fueron muy pequeños, se

representaron en fmol/célula. Los niveles de AMPc calculados se muestran en la Tabla IV.

TABLA IV. Niveles de AMPc en trofozoítos de *E. invadens* incubados en presencia de cafeína 3 mM o de NaF 2.5 mM.

TROFOZOÍTOS	DÍAS DE INCUBACIÓN	[AMPc] fmol/célula
Testigo	2	12.6 ± 0.7
	6	2.6 ± 0.8
	12	0.25 ± 0.05
Cafeína 1 mM	2	1.1 ± 0.15
	6	1.45 ± 0.58
	12	1.17 ± 0.015
NaF 2.5 mM	2	2.6 ± 0.86
	6	1.93 ± 0.75
	12	9.9 ± 1.1

Estos resultados se muestran graficados en la Fig.21.

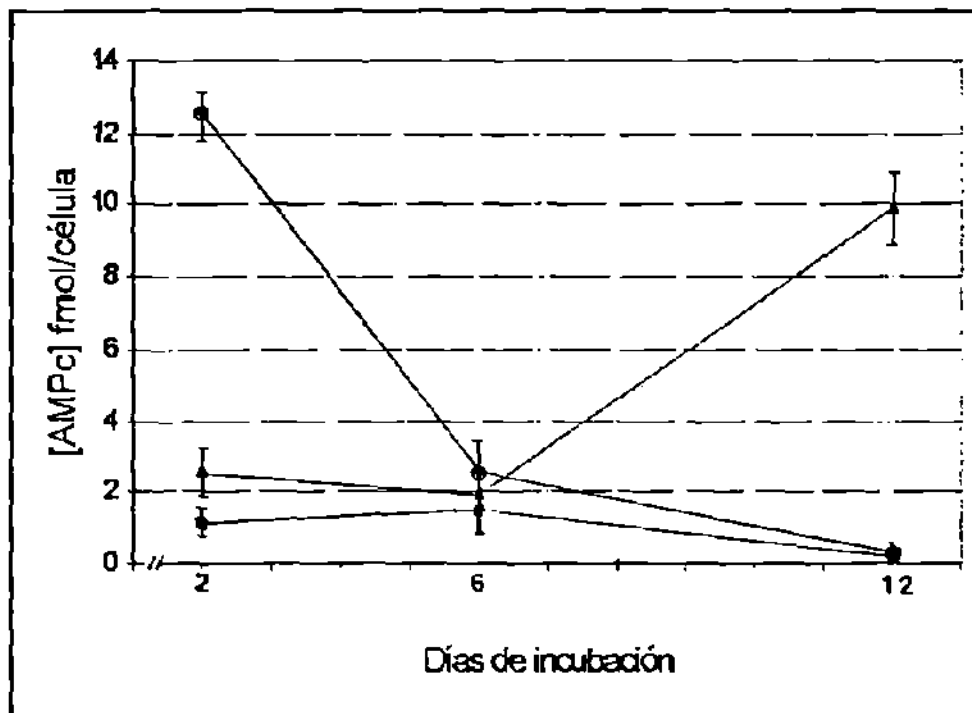


Fig. 21. Niveles de AMPc en trofozoitos de *E. invadens*. Se cultivaron trofozoitos de *E. invadens* en medio TYI-S-33 (-●-) en presencia de cafeína 1 mM (-●-) o de NaF 2.5 mM (-▲-) y se les determinó la concentración de AMPc como se describió en Materiales y Métodos.

X. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMPc EN QUISTES DE *E. invadens*.

En tres series de tubos se inocularon 2×10^4 trofozoitos de *E. invadens* por ml de medio TYI-S-33 completo, en tubos con tapón de rosca y se burbujeó CO_2 durante 2 min. Los tubos se incubaron a 25°C durante 4 días, al cabo de los cuales se sustituyó el medio por TYI-S-33 sin glucosa (LG). Al momento de sustituir el medio, se agregó cafeína 5 mM a una serie de tubos y a otra se le agregó NaF 2.5 mM. Se gasearon con CO_2 y se incubaron durante 4 días más, después de lo cual se hizo el recuento de células totales. Después de eliminar el medio por centrifugación, se agregó un volumen conocido de una solución hipotónica de Tris-EDTA-glucosa como se describió en Materiales y Métodos y el sobrenadante, que contenía el lisado de trofozoitos que no enquistaron, se guardó a -20°C hasta el momento de ser procesado. Los quistes se sometieron a sonicación hasta que fueron lisados por completo.

Las muestras fueron colocadas en un baño de agua hirviendo durante 3 min, con el fin de precipitar las proteínas y eliminarlas después de centrifugar. Se hizo una curva estándar de AMPc como se describió en el apartado 13 de Materiales y Métodos. Además se colocaron 50 μl de ^3H AMPc y después, 100 μl de proteína de alta afinidad por el AMPc. De esta manera se establece un equilibrio entre el AMPc celular y el marcado unidos a la proteína de alta afinidad. El AMPc no enlazado, tanto celular como el radiactivo, se elimina agregando carbón activado y centrifugando posteriormente. Del sobrenadante se transfirieron 150 μl a un vial con líquido de centelleo para detectar la marca en un contador de radiactividad.

Se calculó el promedio de cpm de los viales que contenían sólo AMPc marcado ($[\text{AMPc}]_{\text{celular}} = 0$) y se le restó el promedio de las lecturas de los tubos blanco (a los cuales no se les agregó proteína enlazante; por lo tanto, es lectura de fondo). Al

resultado de esta resta se le llamó Co. A cada una de las muestras se le restó la lectura de fondo y al resultado se le llamó Cx.

Con las lecturas obtenidas se calculó Co/Cx y se determinó la concentración de AMPc tomando como base la curva estándar de [AMPc] de la Fig 19. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla V.

TABLA V. Radiactividad detectada en quistes de *E. Invadens* inducidos en presencia de cafeína 5 mM o de NaF 2.5 mM.

QUISTES	LECTURA CPM
Testigo	4 699
	4 528
Inducidos en presencia de cafeína 5 mM	3 917
	4 147
Inducidos en presencia de NaF 2.5 mM	4 650
	3 842

Nuevamente las cpm de las muestras problema fueron mucho mayores que los del blanco que no tenía AMPc estándar [AMPc] = 0. Por lo tanto, se repitió el experimento, pero esta vez se incluyeron una serie de tubos a los cuales se les agregó la muestra, pero en lugar de la solución de proteína de alta afinidad se les agregó solución amortiguadora Tris-EDTA-glucosa-NaCl. Las cpm detectadas en estas muestras, que teóricamente deberían ser muy cercanas a cero, se muestran en la tabla VI.

TABLA VI. Radiactividad detectada en quistes de *E. invadens* inducidos en presencia de cafeína 5 mM o de NaF 2.5 mM, sustituyendo la proteína de alta afinidad por la solución amortiguadora Tris-EDTA-Glc-NaCl.

QUISTES	LECTURA CPM
Testigo	1 990
Inducidos en presencia de cafeína 5 mM	1 581
Inducidos en presencia de NaF 2.5 mM	784

Con estos datos corregimos restando la lectura obtenida para cada muestra en ausencia de la proteína de alta afinidad por el AMPc (Ca), al valor total de cpm en presencia de dicha proteína (Cm). De esta manera, calculamos $Cx = Cm - Ca$, para después calcular Co/Cx . Posteriormente determinamos el promedio de Co/Cx para luego definir el valor de AMPc en la recta que se obtuvo previamente cuando se utilizaron soluciones estándar de AMPc no marcado y de concentración conocida. Los resultados se muestran en la Tabla VII.

TABLA VII. Concentración de AMPc en quistes de *E. invadens* inducidos en presencia de cafeína 5 mM o de NaF 2.5 mM.

QUISTES	[AMPc] fmol/quiste $\times 10^{-1}$
Testigo	1.1 \pm 0.21
Inducidos en presencia de cafeína 5 mM	2.0 \pm 0.27
Inducidos en presencia de NaF 2.5 mM	3.7 \pm 0.7

Como podemos observar, los niveles de AMPc en los quistes son menores en un orden de magnitud con respecto a los trofozoítos testigo con 2 días de incubación, pero son la mitad del observado para los niveles de AMPc en trofozoítos con 12 días en cultivo. Sin embargo, cuando los quistes son inducidos en presencia de cafeína o de NaF, sus niveles de AMPc son menores en por lo menos un orden de magnitud con respecto a los trofozoítos que fueron cultivados en presencia de la droga respectiva.

DISCUSIÓN

Cafeína y teofilina inhiben el crecimiento y promueven la diferenciación en algunas líneas celulares. Este efecto se debe a que dichas drogas inhiben la acción catalítica de la fosfodiesterasa del AMPc *in vitro*, elevando la concentración de este nucleótido dentro de la célula; por lo tanto, podemos pensar que cafeína y teofilina elevan los niveles intracelulares de AMPc, los cuales tendrían un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y promoverían la diferenciación de *E. invadens*, de manera similar a lo que ocurre en otros sistemas celulares. Los resultados obtenidos en este trabajo, mostraron que tanto la cafeína como la teofilina tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. invadens*, directamente proporcional a la concentración de la droga, contenida en el medio. Sin embargo, contrario a lo que se esperaba, además de inhibir el crecimiento, estas drogas inhibieron también la diferenciación del parásito.

En ausencia de cafeína y teofilina, los niveles de AMPc en los trofozoitos son aproximadamente dos órdenes de magnitud más bajos que en fibroblastos (Kelly y Butcher, 1974) y que en otros parásitos como *T. cruzi* (Rangel-Aldao y col, 1987), pero pueden considerarse semejantes a los que se han reportado en *E. histolytica* (Manning-Cela y col, 1997). Al inicio de la fase exponencial de crecimiento, estos niveles disminuyen paulatinamente conforme aumenta la densidad de población en el medio de cultivo.

Los niveles de AMPc detectados en los trofozoitos crecidos en presencia de cafeína 1 mM son bajos desde el inicio de la fase logarítmica (2 días de incubación); estos niveles son comparables a los detectados en los trofozoitos testigo en la fase estacionaria y se mantienen bajos durante la fase exponencial y la estacionaria.

La L-epinefrina y la 2-hidroxitiramina (dopamina) son agentes estimuladores de la adenilil ciclasa y como ya se mencionó anteriormente, en fibroblastos inhiben el

crecimiento, mientras que en *H. culbertsoni* promueven la diferenciación. En estos sistemas, la adición de estas bioaminas trae como consecuencia un aumento en los niveles de AMPc. Los resultados obtenidos en este trabajo nos sugieren que *E. invadens* carece de receptores para estos agentes, ya que ni la L-epinefrina ni la dopamina mostraron efecto alguno sobre el crecimiento de la cepa IP-1.

En cambio, el NaF, agente que estimula la adenilil ciclase sin la participación de proteína G de membrana, inhibe el crecimiento de esta cepa. Los niveles de este nucleótido en los trofozoitos crecidos en medio adicionado con NaF 2.5 mM son bajos, comparados con los testigos, desde el inicio hasta después que ha pasado la mitad de su fase exponencial y luego se eleva a niveles mucho mayores que en los trofozoitos testigo. Por lo tanto, podemos afirmar que la inhibición del crecimiento de *E. invadens* que observamos, se debe a la presencia de la droga adicionada y que ésta modifica los niveles de AMPc. Sin embargo, en el caso de la cafeína, puede decirse que la inhibición observada es ocasionada por la presencia de la droga, pero se observa más bien una disminución en los niveles de AMPc.

Los niveles de AMPc en los quistes de *E. invadens* son menores que en los trofozoitos. Sin embargo, cuando el enquistamiento es inducido en presencia de NaF o de cafeína, los niveles de AMPc en los quistes formados, son mayores que en los quistes testigo. Es evidente que el proceso de diferenciación es más complejo de lo que parece y que se requiere algo más que un nivel adecuado de AMPc para que se inicie el proceso, y es muy probable que la regulación de los niveles de este nucleótido en *E. invadens* sea diferente de la de otros sistemas celulares. Es muy probable que el factor soluble detectado en el lisado de quistes y trofozoitos, tenga un papel importante en la regulación de los niveles de AMPc, ya que tiene alta afinidad por este nucleótido.

La adición de combinaciones de cafeína y de NaF, inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc y estimulador de la adenilil ciclasa respectivamente, tienen un efecto aditivo, pero no sinérgico de inhibición para el crecimiento y la diferenciación de *E. invadens*.

Los niveles de AMPc en los quistes son mucho más bajos que en los trofozoitos, ya sea que hayan sido inducidos en ausencia o en presencia de cafeína o de NaF (inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc y estimulador de la adenilil ciclasa respectivamente). Sin embargo, es notable que en los quistes que alcanzan a formarse en presencia de cafeína o de NaF, la concentración de AMPc es mayor que en aquéllos que fueron inducidos en ausencia de estas drogas. Esto nos sugiere que el AMPc juega un papel importante en el proceso de diferenciación del género *Entamoeba*. Sin embargo, el mecanismo que dispara este proceso es complejo y muy diferente de lo que ocurre en otros sistemas celulares. Por lo tanto, todavía quedan algunos aspectos por explorar a este respecto, ya que al parecer es necesario que haya una disminución gradual y continua de los niveles de AMPc para que se inicie y complete el proceso de diferenciación en esta cepa de *E. invadens*.

Es importante señalar que algunos factores externos como son la presencia de componentes precipitables presentes en el suero de bovino adulto esterilizado por radiación utilizado para completar el medio, tienen una gran influencia sobre el proceso de diferenciación. Es probable que alguno de esos componentes capture a la droga y anule así su efecto inhibitorio sobre el enquistamiento. Sin embargo, llama la atención el hecho de que los cultivos testigo también enquisten en un tiempo más corto cuando ese precipitado está presente.

Cuando se induce el enquistamiento *in vitro*, se observa la formación de grandes aglomerados de trofozoitos. Por lo tanto, es probable que el material precipitable antes mencionado, al cual se adhieren fácilmente las células, actúe además como un factor que favorezca la formación de grumos y por consiguiente, el contacto entre las células,

lo cual parece ser uno de los requisitos para que se lleve a cabo el proceso de diferenciación a quistes.

También es importante mencionar que en los ensayos de determinación de los niveles de AMPc se detectó la presencia de un factor soluble presente en los quistes y en los trofozoitos, por el cual tiene alta afinidad el AMPc. Es importante destacar que en los quistes testigo y en aquéllos que fueron inducidos en presencia de cafeína o de NaF, la concentración de AMPc varía de manera inversa con respecto a la radiactividad detectada en los ensayos a los que no se les adicionó la proteína de alta afinidad por el AMPc, la cual, de no estar presente dicho factor, debería ser nula. Esto sugiere que la concentración de este nucleótido pudiera ser semejante en todas las muestras de quistes, pero que el elemento soluble presente se encuentra en mayor concentración o con mayor actividad de captación cuando los niveles de AMPc libre son menores. Este elemento soluble podría tener un papel importante en la regulación de los niveles de AMPc y por lo tanto, también en la regulación de la diferenciación.

En algunos de los quistes testigo teñidos con Reactivo de Hoechst 33258 no se observaron núcleos, pero pudimos constatar que al modificar el enfoque del microscopio, algunos núcleos se perdían de vista. Esto puede explicar el hecho de que en algunos quistes no se observaban los núcleos, lo cual no necesariamente significa que los quistes carezcan de esta estructura, lo que además no resulta lógico.

CONCLUSIONES

Cafeína y teofilina, agentes inhibidores de la fosfodiesterasa del AMPc, inhiben tanto el crecimiento como la diferenciación de *E. invadens*.

L-epinefrina y 2-hidroxitiramina, agentes estimuladores de la adenilil ciclasa, no tienen efecto alguno sobre el crecimiento ni sobre la diferenciación de *E. invadens*, a dosis de 10^{-4} y 10^{-5} M.

NaF, agente que estimula la adenilil ciclasa de manera independiente de las proteínas G de membrana, mostró un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. invadens* a una concentración de 2.5 mM. También inhibió la diferenciación de este parásito a concentración de 5 mM y 10 mM

La combinación de cafeína y NaF, agentes estimulador de la adenilil ciclasa e inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc respectivamente, mostraron un efecto inhibitorio más bien aditivo que sinérgico, tanto sobre el crecimiento como sobre la diferenciación de *E. invadens*.

Los niveles de AMPc en trofozoítos de *E. invadens* son bajos y disminuyen gradualmente conforme aumenta el tiempo de crecimiento, de un valor inicial de 12.6 a 0.2 fmol/célula. Sin embargo, cuando crecen en presencia de NaF 2.5 mM, los niveles de AMPc siguen un comportamiento inverso, ya que en un principio son bajos, pero aumentan de un valor inicial de 2.6 a 9.9 fmol/célula en la fase estacionaria. En cambio, los niveles de AMPc en trofozoítos crecidos en presencia de cafeína 1 mM son bajos durante todo el período de crecimiento, con un valor de 1.1 fmol/célula al inicio de la fase logarítmica y 0.2 fmol/célula en la fase estacionaria.

Los niveles de AMPc en los quistes de *E. invadens* son menores que en los trofozoítos crecidos en ausencia de cualquier droga. En cambio, los niveles de AMPc

en quistes inducidos en presencia de cafeína o de NaF, son mayores que los de los trofozoitos testigo.

En los quistes testigo teñidos con Reactivo de Hoechst 33258 se pudieron observar 4 o más núcleos, mientras que en otros quistes, los núcleos no fueron detectados. Cuando los quistes fueron inducidos en presencia de NaF o de cafeína, casi en la totalidad de ellos pudieron detectarse núcleos, pero en la mayoría se observó sólo uno. Tanto los quistes testigo como los inducidos en presencia de NaF o de cafeína fueron viables.

El precipitado que se forma en el suero bovino esterilizado por radiación γ [^{60}Co], utilizado en este trabajo para completar el medio, acelera el proceso de diferenciación de *E. invadens*.

Existe un factor soluble en el lisado de quistes y de trofozoitos de *E. invadens*, por el cual tiene afinidad el AMPc.

BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo-Begovich A, Cárabez-Trejo A (1982). Location of chitin in the cyst wall of *Entamoeba invadens* with colloidal gold tracers. *J Parasitol*; 68(2):253.
- Arroyo-Begovich A, Cárabez-Trejo A, Ruiz-Herrera J (1980). Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *J. Parasitol*; 66:735.
- Avron B, Stolarsky T, Chaayen A, Mirelman D (1986). Encystation of *Entamoeba invadens* IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. *J. Protozool*, 33(4):522.
- Barman T (1969). Enzyme classification. In: *Enzyme handbook*, Springer Berth Ed., N. Y., U.S.A.; II:795.
- Burk R R (1968). Reduced adenyl ciclase activity in a polyoma virus transformed cell line. *Nature*; 219:1272.
- Conti M, Jin S L C, Monaco K, Repaske D, Swinnen J V (1991). Hormonal regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Endocrine Rev*; 12:218.
- Chávez B, Martínez-Palomo A, De la Torre M (1978). Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de *Entamoeba invadens*, *E. histolytica* y *E. coli*. *Arch. Invest. Med (Mex)*;9(Supl 1):113.
- Cho Chung Y S, Clair T, Tortora G, Yokozaki H (1991). Role of site-selective cAMP analogs in the control and reversal of malignancy. *Pharmac Ther*; 50:1.

- Diamond L S, Harlow D R, Cunnick C C (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*; 72:431.
- Diamond L S, Bartigs L (1972). *Entamoeba invadens*: estudio sobre el enquistamiento. *Arch. Invest. Méd.*; 3 Suppl2:447.
- Frank W (1972). Cyclic 3',5' AMP and cell proliferation in cell cultures of embryonic rat cells. *Esp Cell Res*; 71:238.
- García-Zapién A, Hernández-Gutiérrez R, Mora-Galindo J (1995). Simultaneous growth and mass encystation of *Entamoeba invadens* under axenic conditions. *Arch. Med. Res.*; 26(3):257.
- Geiman B, Ratchkiff M (1936). Morphology and life-cycle of an amoeba producing amoebiasis in reptiles. *Parasitol*;28:208.
- Gerish G (1987). Cyclic AMP and other signals controlling cell development and differentiation in *Dictyostelium*. *Ann. Rev. Biochem.*; 56:853.
- Gicquaud C y Tremblay N (1991). Observations with Hoechst staining of amitosis in *Acanthamoeba castellanii*. *J Protozool* 38;3:221.
- Gilman A G (1970). A protein binding assay for adenosin 3'-5'-cyclic monophosphate. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.*;67:305.
- Gill G N, Garren L D (1971). Role of the receptor in the mechanism of action of adenosine 3'.5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci, U.S.A.*; 68: 786.

- Glass D B, Krebs E G (1980). Protein phosphorylation catalyzed by cyclic AMP-dependent and cyclic GMP-dependent protein kinases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*; 20:363.
- González J, Fevert U, Corey E J, Nussenzweig V, Eichinger D (1997). Proteasome fuction is required for encystation of *Entamoeba invadens*.
- González-Perdomo M, Romero P, Goldenberg S (1988). Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Exp. Parasitol*;66:205.
- Hebdon M, Le Vine III H, Sahyoun N, Schmitges C J, Cuatrecasas P (1978). Properties of the interaction of fluoride and guanylyl-5'-imidophosphate-regulatory proteins with adenylate cyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*;75:3693.
- Hepp K D, Renner R (1972). Insuline action on the adenyl cyclase system: antagonism to activation by lipolytic hormones. *FEBS*;28:191.
- Kay R (1982). cAMP and spore differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 79:3228.
- Kelly L A, Butcher R W (1974). The effects of epinephrine and prostaglandin E1 on cyclic adenosine 3'-5'- monophosphate levels in WI-38 fibroblasts. *J Biol Chem*; 249:3098.
- Linder M E, Gilman A G(1992). G proteins. *Sci Am*; 267:32.
- Mann S K, Firtel R A (1991). Regulation of gene expression and cell-type differentiation via signal transduction processes in *Dictyostelium*. In: Monod J

- J, Camblier J C, Weiss A, Ed. **Advances in regulation of cell growth, cell activation: genetic approaches.** New York N Y; 2:9.
- Manning-Cela R, Meza I (1996). **Up-regulation of actin mRNA and reorganization of the cytoskeleton in *Entamoeba histolytica* trophozoites.** J. Euk. Microbiol;44:34.
- Manning-Cela R, Piña A, Meza I (1997). **cAMP levels and up-regulation of actin mRNA in *Entamoeba histolytica*.** Arch. Med. Res;28 (Suppl):S134.
- Martinez-Palomo A (1982). **The biology of *Entamoeba histolytica*.** Primera edición. Research studies Press-John Wiley & Sons LTD. pp 161.
- Mata- Cárdenas B D, Saíd-Fernández S (1990). **Desarrollo de un medio simplificado para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*.** Arch Invest Med (Mex); 21:247.
- Morales-Vallarta M, Villarreal-Treviño L, Guerrero-Medrano L, Ramírez-Bon E, Navarro-Marmolejo L, Saíd-Fernández S, Mata-Cárdenas B D,(1997). ***Entamoeba invadens* differentiation and *Entamoeba histolytica* cyst-like formation induced by CO₂.** Arch Med Res;28(Suppl):s150-s151.
- Nayyeem M A, Haibullah c M, Saleem Y Quadri G S A (1993). ***In vitro* encystation and excystation of *Entamoeba histolytica* trophozoites.** Indian J Exp Biol 31:562-563.
- Otten J, Johnson G S, Pasta I (1971). **Cyclic AMP levels in fibroblasts; relationship to growth rate and contact inhibition of growth.** Biochem Biophys Res Commun; 44:1192.

- Otten J, Johnson G S, Pastan I (1972). Regulation of cell growth by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. Effect of cell density and agents which alter cell growth on cyclic adenosine 3'-5'- monophosphate levels in fibroblasts. *J Biol Chem*; 247:7028.
- Oye I, Sutherland W (1966). The effect of epinephrine and other agents on adenyl cyclases in the cell membrane of avian erythrocytes. *Biochem Biophys Acta*;127:354.
- Pall M L (1981). Adenosine 3'-5'-monophosphate in fungi. *Microbiol Rev*; 45:462.
- Pierce N F, Greenough III W B, Carpenter Jr Ch C J (1971). *Vibrio cholerae* enterotoxin and its mode of action. *Bacteriol Rev*;35:1.
- Portillo I (1992). Consideraciones al método de diferenciación de *Entamoeba invadens* por alta tensión de CO₂. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. U.A.N.L., México.
- Puck T (1977). Cyclic AMP, the microtubule-microfilament system and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*; 74 (10):4491.
- Raizada M K, Krishna-Murti C R (1972). Transformation of trophic *Hartmannella culbertsoni* into viable cysts by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *J Cell Biol*; 52:743.
- Rangel-Aldao R, Allende O, Triana F, Piras R, Henríquez D, Piras M (1987). Possible role of cAMP in differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*; 22:39.

- Rengpien S, Bailey G B (1975). Differentiation of *Entamoeba*: a new medium and optimal conditions for axenic encystation of *E. invadens*. *J Parasitol*; 61:24.
- Ryan W L, Heidrick M L (1968). Inhibition of cell growth in vitro by adenosine 3'.5'-monophosphate. *Science*; 162:1484.
- Saíd-Fernández S, Mata-Cárdenas B D, CastroGarza J, Martínez-Rodríguez H, Navarro-Marmolejo L, Lozano Garza G (1992). Axenic massive cultivation of *Entamoeba histolytica* trophozoites in spinner flasks and in a microfermentor. *Arch Med Res*; 23(2):57.
- Saíd-Fernández S, Mata-Cárdenas B D, González-Garza M T, Navarro-Marmolejo L, Rodríguez-Pérez E (1993). *Entamoeba histolytica* cysts with a defective wall formed under axenic conditions. *Parasito Res* 79:200.
- Saíd-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas B D, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G, Martínez-Rodríguez H (1988). PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*; 82:249.
- Sepúlveda B, Martínez-Palomo (1982). The immunology of amoebiasis produced by *Entamoeba histolytica*. In: Cohen S, Warren K S (Ed): *Immunology of Parasitic infections*, Oxford, Blackwell Scientific Publications, p. 179.
- Sheppard J R (1971). Restoration of contact inhibition growth to transformed cells by dibutyryl adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*; 68:1316.

- Shvla G, Backer D S (1961). Ultraviolet microscopy of *Entamoeba invadens*. *J Parasitol*;47:557.
- Snyder S H (1985). The molecular basis of communication between cells. *Sci Am*;253:132.
- Spangler B D (1992). Structure and fuction of cholerae toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxine. *Microbiol Rev*; 56:622.
- Stadel J M, Lefkowitz R J (1991). Beta-adrenergic receptors. In J P Perkins De. The beta-adrenergics receptors. New York, N Y. The human Press Inc: 1.
- Stiles G I (1991). Drug and hormonal regulation of the beta-adrenergic receptor-adenylate cyclase system. In: J P Perkins Ed. The beta-adrenergic receptors. New York. The humana Press, Inc.:345.
- Strickler J E, Patton C L (1975). Adenosine 3'.5'-monophosphate in reproducing and differentiated *Trypanosomas*. *Science*; 190:1110.
- Sutherland E W (1972). Studies on the mechanism of hormone action. *Science*; 177:401.
- Vazquezdelara-Cisneros L G, Arroyo Begovich A (1984). Induction of encystation of *Entamoeba invadens* by removal of glucose from the culture medium. *J Parasitol*;70(5):629.
- Verma K K, Raizada M K, Krishna-Murti C R (1974). Effect of bioamines on the cellular differentiation of *Hartmanella culbertsoni*. *Biochem Pharmacol*; 23:57.

Voet D, Voet J (1990). Control of metabolic flux. In: Biochemistry. Ed. Wiley, U.S.A, pp452.

Walsh A J (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Stimulation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis;8:228.

Watts D J (1984). Protein synthesis during development and differentiation of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. Biochem; 220:1.

Williams J (1988). The role of diffusible molecules in regulating the cellular differentiation of *Dictyostelium discoideum*. Development;103:1.



