



**SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION  
Y ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**ACTIVIDAD CITOLITICA DE ENTAMOEBA HISTOLYTICA  
DEPENDIENTE DEL POTENCIAL DE OXIDO-REDUCCION**

**TESIS**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA  
MEDICA**

**PRESENTA**

**BIOL. M.C. JORGE ENRIQUE CASTRO GARZA**

**MONTERREY, N.L.**

**MARZO DE 1992**

TD  
RC121  
.A5  
C37  
1992  
c.1



1080125914

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSTGRADO



ACTIVIDAD CITOLITICA DE *Entamoeba histolytica*  
DEPENDIENTE DEL POTENCIAL DE OXIDO-REDUCCION.

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA

PRESENTA EL

BIOL. M.C. JORGE ENRIQUE CASTRO GARZA

MONTERREY, N.L.

MARZO DE 1992

TO

RC121

.A5

C37

1992



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

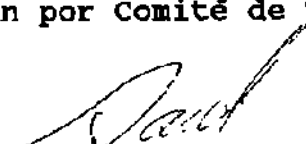
SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSTGRADO

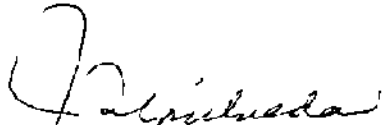
ACTIVIDAD CITOLITICA DE *Entamoeba histolytica*  
DEPENDIENTE DEL POTENCIAL DE OXIDO-REDUCCION.

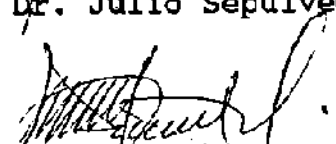
TESIS  
QUE EN OPCION AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA  
PRESENTA EL

BIOL. M.C. JORGE ENRIQUE CASTRO GARZA


Aprobación por Comité de Tesis.

  
Presidente: Dr. Salvador Said Fernández (Asesor).

  
Secretario: Dr. Julio Sepúlveda Saavedra.

  
1er. Vocal: Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla (Coasesor).

  
2do. Vocal: Dra. Socorro Flores de Castañeda.

  
3er. Vocal: Dra. Herminia Martínez Rodríguez.

MONTERREY, N.L.

MARZO DE 1992

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN  
EL LABORATORIO DE LA DIVISION DE BIOLOGIA CELULAR  
DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DEL NORESTE,  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL,  
BAJO LA ASESORIA DEL DR. SALVADOR SAID FERNANDEZ.  
Y FUNGIENDO COMO COASESOR EL DR. MANUEL RODRIGUEZ QUINTANILLA  
DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA  
DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON.

**DEDICATORIA.**

**A:**

**JESUCRSITO.**

**A MIS PADRES:**

**ENRIQUE Y MARIA DEL SOCORRO.**

**A LA MEMORIA DE MI ABUELA MATERNA:**

**CONSUELO VALERO DE GARZA. (1989)**

**Y**

**A LA MEMORIA DE MI ABUELO PATERNO:**

**ALFONSO CASTRO BISTRAIN. (1990)**

**QUIENES NOS DEJARON EN EL TIEMPO DE LA REALIZACION DE ESTA TESIS.**



## AGRADECIMIENTOS.

Llegar hasta aquí es para mí toda una satisfacción. Han sido cinco años de estar luchando por llevar a buen término este trabajo, a veces completamente estable en todas las áreas y en otras ocasiones un poco vacilante y con ganas de dejarlo inconcluso, pero siempre las bendiciones de Dios se manifestaban y favorecían la continuación de mi trabajo y renovaban mis fuerzas. Tanto así ha sido también el apoyo incondicional y total que siempre he recibido de mi familia, empezando por mis padres Enrique y Ma. del Socorro, y también de mi hermana Mireya y mi hermano Alán junto con su esposa Sandra y su hijo Mauricio.

Aunque esta tesis sea nominativamente mía, en ella van implicadas muchas personas que han colaborado, ya sea en el área de trabajo, en la escuela o con su amistad. No siempre se puede agradecer a todos los que uno quisiera, pero al menos si quiero nombrar al Dr. Salvador Said, quien ha sido una persona fundamental en mi formación como investigador y me ha apoyado en todos los aspectos relacionados a esta carrera.

También he de agradecer a todo el personal de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, que de alguna u otra forma han contribuido a la culminación de esta tesis. Entre ellos a los señores Ignacio Atristain y Luis Rodríguez, así como a mis compañeros de laboratorio: Biol. Ma. Teresa Gonzalez Garza, M.C. Benito Mata, Q.F.B. Leticia Navarro, M.V.Z. Gerardo Lozano, Sr. Manuel Gutiérrez y Srita. Alma D. Juárez, sin olvidar a Victoria Moreno. Muchas personas más también han contribuido conmigo, si no en el área de trabajo directamente, si brindandome su amistad, muchas gracias a todos ellos.

Gracias al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. que encabeza el Dr. Manuel Rodríguez, por ser parte de mi formación como investigador. Tanto a los maestros que me enseñaron como a mis compañeros de estudios y personal del Departamento con quienes llevo una buena amistad.

A la Dra. Herminia Martínez, Dra. Socorro Flores y al Dr. Julio Sepúlveda, gracias por aceptar formar parte de mi comisión de tesis y por sus aportaciones y sugerencias a mi trabajo.

Al Dr. Antonio Luna por el trabajo gráfico que ilustra esta tesis.

Fuera de los aspectos laborales hay una gran cantidad de amistades, a quienes agradecer. Sin embargo, si quisiera nombrar a todos, no acabaría y como siempre sucede se me pasaría algún nombre. Para evitar esto, les doy las gracias a todos y siéntanse incluidos como si su nombre estuviera escrito aquí.

A quien no puedo dejar de nombrar y agradecerle que esté a mi lado, siendo mi motivación de seguir avanzando es a mi novia Martha Garza. Gracias por tu apoyo, amor y esperanza que me das.

Marzo 1992.

## INDICE.

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCION.	
	Antecedentes.....	4
	Hipótesis.....	13
	Objetivos.....	13
	Secuencia del trabajo experimental.....	14
III.	MATERIALES.	
	A. Material Biológico.....	15
	B. Preparación del medio de cultivo McCoy.....	15
	Preparación del medio basal McCoy (1X).....	15
	Solución de antibióticos (100X).....	16
	Preparación y almacenamiento del medio completo.....	16
	C. Preparación del medio de cultivo PEHPS.....	16
	Medio basal PEHP.....	16
	Medio completo PEHPS.....	17
	D. Suero bovino y suero de ternera.....	17
	E. Composición y preparación de las soluciones.....	18
	Tripsina al 2.5 %.....	18
	Tripsina al 0.25%.....	18
	Solución de rojo de fenol al 1%.....	18
	Amortiguador de pH isotónico de tris (TD)....	18
	Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)....	19
	Solución salina balanceada de Hank (SSB 1X)..	19
	SSB 1X con modificaciones.....	19
	Acido $\alpha$ [ <sup>14</sup> C] amino isobutírico ([ <sup>14</sup> C]AIB)....	20
	F. Origen de los reactivos.....	20
IV.	METODOS.	
	A. Cultivo de células de la línea CHO.....	22
	Resiembra y mantenimiento.....	22
	Criopreservación de las células.....	22
	Limpieza de la incubadora de CO <sub>2</sub> .....	23
	B. Cultivos amibianos axénicos.....	23
	Tratamiento del material para cultivo.....	23
	Resiembra y cosecha.....	24
	Cultivos masivos.....	24
	C. Obtención de extractos amibianos.....	25
	D. Marcaje de los cultivos de células CHO con [ <sup>14</sup> C]AIB.....	27
	E. Cuantificación de la actividad citolítica por el método de cuenta total y determinación de viabilidad por la exclusión del azul de tripano.....	27

F. Validación del modelo de cuenta total y determinación de viabilidad por la exclusión del azul de tripano.....	30
G. Determinación del potencial de óxido-reducción ( $Eh^{\circ}$ ).....	33
H. Efecto del potencial de óxido-reducción sobre la actividad citolítica.....	33
I. Distribución subcelular de la actividad citolítica dependiente del potencial de óxido-reducción.....	34
J. Determinación de la actividad fosfolipásica..	34
K. Efecto del potencial de óxido-reducción sobre la actividad fosfolipásica.....	35
L. Caracterización de la actividad citolítica dependiente del potencial de óxido-reducción.	36
Efecto del pH sobre la actividad citolítica.	36
Efecto de la preincubación a diferentes temperaturas y ciclos de congelación-descongelación sobre la actividad.....	37
Efecto de la iodoacetamida sobre la actividad citolítica.....	38

## V. RESULTADOS

A. Validación del modelo de cuenta total y determinación de viabilidad por la exclusión del azul de tripano.....	39
B. Efecto del potencial de óxido-reducción sobre la actividad citolítica.....	39
C. Efecto del potencial de óxido-reducción sobre la actividad fosfolipásica.....	43
D. Distribución subcelular de la actividad citolítica ambiana.....	46
E. Efecto del pH sobre la actividad citolítica..	46
F. Efecto de la preincubación a diferentes temperaturas y ciclos de congelación-descongelación sobre la actividad citolítica.	46
G. Dependencia de grupos -SH.....	52

## VI. DISCUSION.

Discusión.....	54
Conclusiones.....	61
Perspectivas.....	62

## VII. REFERENCIAS..... 65

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.

### FIGURAS.

1.	Diagrama de flujo del fraccionamiento de los extractos amibianos.....	26
2.	Diagrama de flujo del modelo de cuenta total y viabilidad.....	29
3.	Diagrama de flujo del modelo del [ <sup>14</sup> C]AIB.....	31
4.	Comparación de dos métodos para medir actividad citolítica.....	40
5.	Efecto del potencial de óxido-reducción sobre la actividad citolítica de SLO.....	41
6.	Actividad citolítica amibiana dependiente del Eh°.....	42
7.	Efecto del Eh° sobre la actividad fosfolipásica de veneno de abeja.....	44
8.	Efecto del Eh° sobre la actividad fosfolipásica amibiana.....	45
9.	Efecto del pH sobre la actividad citolítica dependiente del Eh°.....	48
10.	Efecto de la preincubación de la fracción S30 a 36°C.....	49
11.	Efecto de la preincubación de S30 a temperatura de ebullición.....	50
12.	Efecto de los ciclos de congelación-descongelación sobre la actividad citolítica.....	51
13.	Dependencia a grupos -SH de la actividad citolítica.....	53

### TABLAS

1.	Actividad citolítica específica de las fracciones subcelulares de <i>Entamoeba histolytica</i> cepa HM38.....	47
2.	Tabla comparativa de las características de las citolisinas amibianas.....	64

## ABREVIATURAS

Eh°	Potencial de óxido-reducción.
[ <sup>14</sup> C]AIB	Acido α[ <sup>14</sup> C] amino isobutírico.
SLO	Estreptolisina-O.
DTT	Ditiotreitol.
PEHPS	Medio de cultivo para amibas (Iniciales de Peptona, Extracto de Hígado y Páncreas, Suero)
CHO	Células de ovario de hámster chino.
M	Megaohms.
mOsm	Miliosmoles.
TD	Amortiguador de pH isotónico de tris.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
SSB	Solución salina balanceada de Hank.
μC	Microcuries.
μl	Microlitros.
ml	Mililitros.
mmol	Milimoles.
<u>M</u>	Molar.
<u>N</u>	Normal.
g	Gramos.
h	Horas.
mm	Milímetros.
°C	Grados centígrados.
min	Minutos.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
Xg	Geis.
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados.
ET	Extracto total
P30	Fracción subcelular amibiana P30.
S30	Fracción subcelular amibiana S30.
N	Fracción subcelular nuclear amibiana.
SAB	Seroalbúmina bovina.
mV	Milivolts.
LES	Liberación específica de marcador radiactivo.
LEx	Liberación experimental de marcador radiactivo
LE	Liberación espontánea de marcador radiactivo.
LM	Liberación máxima de marcador radiactivo.
mU	Miliuinidades.

## I. RESUMEN.

*Entamoeba histolytica* es el protozoario parásito responsable de la amibiasis. Esta enfermedad tiene diversas manifestaciones que incluyen infecciones asintomáticas e infecciones clínicas como disentería, diarrea, lesiones intestinales e invasiones extraintestinales, de las cuales las hepáticas son las más frecuentes. Los casos en etapas avanzadas de la enfermedad que no han recibido una atención adecuada, pueden ser causa de muerte.

Parte fundamental en el proceso patogénico por el cual *E. histolytica* produce las lesiones en los tejidos, es la actividad lítica sobre las células del hospedero. Esta actividad ha sido detectada tanto en trofozoítos vivos como en extractos libres de células, utilizando como blanco eritrocitos de diversas especies de mamíferos, tejidos aislados de animales de experimentación o diferentes líneas celulares en cultivo. Como factores responsables de esta actividad han sido implicadas principalmente dos moléculas: una fosfolipasa  $A_2$  dependiente de calcio y la amebaporo.

Los efectos de la actividad citolítica que se caracteriza aquí son inmediatos y fueron detectados usando como blanco células CHO. Se manifiestan produciendo protusiones en la membrana celular, vacuolización e hinchamiento de las células. Estos efectos son claramente visibles al microscopio de luz a los 8 min de incubación. Las lesiones se circunscriben a zonas delimitadas de la membrana plasmática y el efecto es irreversible, pues las células dañadas se lisan aún después de lavarlas y reincubarlas en

medio fresco suplementado con 15% de suero de ternera.

Mediante un modelo sencillo, confiable y ampliamente utilizado, como lo es la determinación del número celular y la viabilidad en cultivos celulares, se ha podido cuantificar la actividad citolítica en extractos amibianos y se ha establecido que *E. histolytica* tiene una actividad citolítica dependiente del potencial de óxido-reducción, y que depende específicamente de grupos -SH. Esta actividad es la primera de este tipo descrita en amibas, y es debida a un factor celular amibiano diferente a la fosfolipasa y a la amebaporo, las cuales son las dos citolisinas amibianas que han sido purificadas y caracterizadas. La actividad se encuentra principalmente en la fracción S30, obtenida después de una centrifugación a 30,000 Xg por 15 min. El pH óptimo de la actividad citolítica amibiana dependiente del  $Eh^{\circ}$  es 7.0. Es termolábil, pues se inactiva a los 6 min de incubación a temperatura de ebullición. La actividad también se pierde al incubar la fracción S30 por 3 h a 36°C. Los ciclos de congelación-descongelación (hasta 3 ciclos) no afectan la actividad.

La actividad citolítica amibiana dependiente de  $Eh^{\circ}$  se manifiesta en potenciales similares a los existentes en el intestino grueso, sitio donde generalmente las amibas inician la invasión a los tejidos. Las lesiones provocadas por esta actividad son muy semejantes a las descritas por otros autores, en epitelio intestinal aislado de cobayo infectados experimentalmente con trofozoítos vivos. Por estas razones es posible que el factor

responsable de la actividad citolítica dependiente de Eh<sup>o</sup>, tenga un papel importante en las fases iniciales de la invasión amibiana en el intestino.

Además con la caracterización llevada a cabo, ahora es posible purificar el factor responsable, secuenciarlo y efectuar su clonación en un banco de DNA, para después analizar su contribución específica en el mecanismo patogénico de la amibiasis.



## II. INTRODUCCION.

*Entamoeba histolytica* es el protozoario parásito responsable de la amibiasis (1). Esta enfermedad es un grave problema de salud pública, pues se estima que la padece el 10% de la población mundial. Además ocupa el tercer lugar como causante de muertes producidas por parásitos, solamente superada por la malaria y la esquistosomiasis (2).

La infección se produce cuando se ingieren quistes del parásito en alimentos o agua contaminada con materia fecal humana. Estas formas resistentes liberan trofozoítos cuando llegan al intestino y se digiere la pared celular. Los trofozoítos pueden vivir como comensales o pueden invadir la mucosa intestinal y causar disentería. A partir del intestino las amibas son capaces de diseminarse a cualquier otro órgano, principalmente al hígado (3,4). La razón por la cual las amibas son capaces o no de invadir tejidos no está muy clara, aunque las más recientes evidencias apuntan hacia la idea de que existen dos tipos de cepas de *E. histolytica*, un tipo patógeno y otro no patógeno. Pero hasta ahora no se ha demostrado concluyentemente la existencia de los dos tipos de cepas.

Las isoenzimas del metabolismo de carbohidratos, de cepas aisladas de sujetos con amibiasis invasiva intestinal o de absceso hepático amibiano y consideradas como patogénicas, tienen ciertos patrones electroforéticos característicos. A estos patrones se les conoce como zimodemos. En tanto las cepas aisladas de

portadores asintomáticos y consideradas como cepas no patogénicas, tiene zimodemos también característicos, pero diferentes a los de las cepas patogénicas (5,6). Sin embargo, se ha encontrado que cambios experimentales de la flora asociada a las amibas durante su axenización, pueden convertir un zimodemo no patogénico en uno patogénico (7,8). Pero estos hallazgos no son sistemáticos y no puede excluirse la posibilidad que el cambio observado fuera debido a la selección de una subpoblación no detectada (8).

Otras evidencias que refuerzan la idea de dos tipos de cepas, son las diferencias que se han encontrado entre cepas patogénicas y no patogénicas, mediante el uso de anticuerpos monoclonales (9,10), así como por pruebas de hibridización de DNA (11) y por análisis de fragmentos de restricción del DNA amibiano (12).

En la amibiasis, la producción de lesiones necróticas se circunscribe a los sitios invadidos por las amibas (13), lo que indica que la virulencia amibiana depende esencialmente de su invasividad, propiedad en la que desempeña un papel importante la citólisis (14,15). Otras actividades biológicas de las amibas, como la fagocitosis (16), la hidrólisis del moco que recubre y protege al intestino (17), la disolución del cemento celular y de la colagena (18,19,20), así como la acción de otras enzimas no específicas (22,23) y actividades tóxicas (24,25), son también esenciales en la destrucción de los tejidos.

Algunos autores no han observado citólisis en productos amibianos o en extractos libres de células, pero sí la observaron

con trofozoítos activos, por lo que han concluido que la citólisis mediada por contacto depende de la integridad y actividad de los trofozoítos. Durante el proceso de citólisis mediada por contacto, ocurren tres pasos secuenciales bien caracterizados (15). Primero ocurre la adherencia de las amibas a las células blanco mediante receptores de membrana específicos. Se han descrito varias adhesinas que pueden estar involucradas en el reconocimiento y adhesión de las amibas a las células blanco (26-31) Las dos lectinas de superficie mejor identificadas son una inhibible por N-acetil-glucosamina (28) y otra por galactosa/N-acetil-galactosamina (30). El segundo paso de la citólisis mediada por contacto es la lisis de la célula adherida y por último, como tercer paso ocurre la fagocitosis de la célula lisada.

Nuestro grupo ha podido detectar y caracterizar actividad hemolítica (32) y citolítica (33,34) en extractos libres de células, lo cual es indispensable para la identificación y aislamiento de los factores responsables de la citólisis. La actividad hemolítica se localiza principalmente en la fracción vesicular P30 (35) y esta actividad se incrementa hasta 100 veces cuando se preincuba 36 h a 36°C (36). En esta misma fracción fue donde inicialmente se detectó la actividad citolítica (33,37).

Existen dos productos amibianos que se consideran como citolisinas: Una fosfolipasa A<sub>2</sub>, dependiente de calcio (38,39,40) y la proteína formadora de poros o amebaporo (41,42,43). Las dos

moléculas han sido purificadas a homogeneidad (38,44,45).

La actividad fosfolipásica se encuentra principalmente en la misma fracción amibiana que contiene la mayor actividad hemolítica (38,46). Está compuesta por un sólo componente protéico, con peso molecular de 15,000 Da. Tiene un pH óptimo de 8.0 y su punto isoeléctrico es de 7.0. Presenta acción lítica directa sobre eritrocitos humanos y células nucleadas de la línea de células de ovario de hámster chino (CHO). La acción lítica es inhibible con el inhibidor de Rosenthal (un análogo de la fosfatidilcolina) y con altas concentraciones de seroalbúmina (38). Cuando se incuban trofozoítos en presencia de inhibidores específicos de fosfolipasa, la citólisis mediada por contacto disminuye (39).

La amebaporo es una proteína que despolariza la membrana de células blanco (41), así como membranas lipídicas planares artificiales (41) y liposomas (44), al inducir un flujo selectivo de iones (44,45). Se ha logrado purificar a partir del sobrenadante de 150,000 Xg de lisados de amibas y se encontró que existe como un aparente dímero. Se han purificado dos isoformas de esta proteína, una con pI de 6.8 y la otra con pI de 5.3. Tiene peso molecular de 28-30 KDa en su forma nativa y de 13-15 KDa bajo condiciones desnaturalizantes o reductoras. El efecto de formación de poros y despolarización de membranas ocurre tan pronto entran en contacto la amebaporo y la membrana blanco, por lo que se ha relacionado a la amebaporo como un factor importante en la citólisis mediada por contacto, la cual ocurre en unos

minutos (43,45,47). Sin embargo, el efecto de la amebaporo es reversible y aún pura no es hemolítica para eritrocitos humanos o de conejo (43). Células blanco, como macrófagos y linfocitos de bazo de ratón se recuperan después del tratamiento (41). Aunque otros autores si han observado efectos líticos de la amebaporo pura (45). Se ha sugerido la oligomerización de protómeros activos durante la formación de los poros membranales (47). Recientemente se purificó a aparente homogeneidad un péptido amibiano con un pH óptimo de 5.2, que forma poros de 4-5 KDa, el cual pudiera ser la forma monomérica de la amebaporo. Además se logró su secuenciación y se estableció que su estructura espacial es muy parecida a la melitina, un péptido lítico del veneno de abeja y que potencia la acción de las fosfolipasas (45).

La mayor parte de los conocimientos que se tienen sobre la biología amibiana se han producido a partir de que se logró cultivar axénicamente a *E. histolytica*, en el medio TPS-1 de Diamond (48), el cual permite el crecimiento y el subcultivo *in vitro* de las amibas por tiempo indefinido, aunque posiblemente en este medio, o en TYI-S-33, descrito posteriormente (49), las amibas no se mantienen con todas las características biológicas que le confieren su éxito como parásito del hombre. Se ha observado que cepas de *E. histolytica* subcultivadas axénicamente por tiempos largos, pierden su virulencia (50,51) y la capacidad de enquistarse (52,53). La primera propiedad se recupera al cultivar las amibas en presencia de colesterol (54), haciendo

pasajes seriados *in vivo* en hígados de hámsters (55), o cultivando las amibas con trozos de hígado de hámsters (56). El enquistamiento no se ha logrado reproducir en cultivos axénicos, aunque nuestro grupo ha hecho avances importantes en este sentido, utilizando el medio PEHPS (57,53). Como las anteriores, posiblemente otras características de las amibas también se modifican durante el subcultivo. Además son pocas las cepas de amibas que logran axenizarse. La mayoría de ellas se pierden al intentar separarlas de los microorganismos originalmente asociados con ellas en el intestino.

*E. histolytica* habita normalmente en el colon. En él existen condiciones con un potencial de óxido-reducción ( $Eh^{\circ}$ ) negativo. Sin embargo, ya que *E. histolytica* es un organismo microaerofílico, muy adaptable, crece bien aún cuando no se maneje con los cuidados especiales que requieren los microorganismos anaeróbicos o microaerofílicos, lo cual simplifica su subcultivo. De esta manera, los estudios sobre la actividad citolítica y la gran mayoría de los estudios llevados a cabo con *E. histolytica* en condiciones axénicas, se han realizado sin analizar el efecto del potencial de óxido-reducción sobre las actividades amibianas.

Diversos investigadores han enfatizado la importancia del  $Eh^{\circ}$  sobre algunas de las actividades biológicas de *E. histolytica*. Cultivando amibas asociadas a bacterias, se encontró que el mejor potencial para tener un buen crecimiento y producir el enquistamiento está entre -114 a -150 mV (58), por lo que se

propuso que la flora bacteriana provee las condiciones adecuadas, tales como anaerobiosis, pH y otros factores favorables para la actividad metabólica de las amibas (59, 60). En este mismo sentido, se observó que ciertas especies bacterianas contribuyen a aumentar o a restituir la virulencia amibiana en cultivos monoxénicos (4,50,61,62). En cultivos axénicos se ha resaltado la importancia de un  $Eh^{\circ}$  bajo, una baja tensión de oxígeno y el uso de agentes reductores en el medio de cultivo para que *E. histolytica* inicie el crecimiento a partir de inóculos pequeños (63-69).

Lamentablemente, aún teniendo esta información, no se ha estudiado sistemáticamente un posible mecanismo patogénico anaeróbico de las amibas en condiciones axénicas. Este punto de vista es muy interesante porque las amibas inician la invasión en el intestino grueso donde predomina un ambiente de anaerobiosis. La posible existencia de actividades tóxicas, específicamente de citolisinas lábiles al oxígeno o dependientes del  $Eh^{\circ}$  en *E. histolytica*, coincide con los daños iniciales provocados por los trofozoítos en las células de la mucosa intestinal. Dichas lesiones celulares se manifiestan como protusiones en la membrana celular que aumentan de tamaño al pasar el tiempo hasta que la célula se lisa.

Las lesiones descritas por numerosos investigadores en órganos aislados o en células en cultivo, expuestos al ataque de trofozoítos íntegros y activos (70,71,72), son muy semejantes a

las encontradas por nosotros en células CHO tratadas con extractos amibianos, libres de trofozoítos (34,37). Este efecto detectado inicialmente en la fracción P30 se produce sobre las células desde los primeros segundos de contacto. Es decir, el efecto es inmediato. Además este daño producido en las células por la actividad presente en los extractos amibianos es localizado e irreversible, ya que afecta áreas delimitadas de la membrana plasmática y las células se lisan aún lavándolas después del contacto con el extracto amibiano y reincubándolas en medio fresco con suero. La potencia de esta actividad está directamente relacionada con la virulencia de las cepas (37).

Fué posible detectar y cuantificar la actividad citolítica amibiana mediante un modelo que adaptamos basado en el de Thelestam y Möllby (73). El modelo se basa en la cuantificación de la salida de un marcador radiactivo de células blanco premarcadas, por efecto de un agente citolítico. El marcador utilizado fue ácido  $\alpha$ [ $^{14}\text{C}$ ] amino isobutírico, un aminoácido no natural que permite detectar lesiones membranales pequeñas y a corto tiempo (37). Ahora, en este trabajo se adaptó otro método para cuantificar actividad citolítica, en el cual se cuantifica el número total de células y la viabilidad celular por la exclusión de un colorante vital, de los cultivos celulares tratados con respecto a los testigos. Con este modelo se ha podido determinar que la actividad citolítica amibiana es dependiente del  $\text{Eh}^\circ$ , específicamente de grupos -SH. Se encuentra principalmente en la



fracción S30 y además ha sido posible su caracterización.

Por las características de la actividad se trata de una citolisina no descrita hasta ahora, diferente de la fosfolipasa y de la amebaporo y podría ser muy importante en las fases iniciales de la invasión amibiana en el intestino.

Por sus características fisicoquímicas mas bien se asemeja a las citolisinas lábiles al oxígeno. Estas citolisinas lábiles al oxígeno o activadas por grupos tioles, constituyen toda una familia de citolisinas bacterianas producidas por quince especies de bacterias de los generos *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Listeria*. Estas citolisinas comparten varias características en común, como la inactivación por oxidación así como su reactivación por ciertos agentes reductores. Tambien cruzan inmunológicamente unas con otras. La secuencia aminoacídica de las citolisinas que se han logrado secuenciar, es muy semejante. Su punto de unión en las membranas es el colesterol y luego se insertan en las membranas formando en ellas estructuras de arco o anillo hasta de 100 monómeros, produciendo hoyos en la membrana y permitiendo la salida de macromoléculas de la célula, que llevan a la muerte celular. En la oligomerización el colesterol ya no es requerido. La citolisina de este tipo mejor caracterizada es la estreptolisina-O (SLO), la cual es considerada como el prototipo de este grupo de citolisinas (82-86,90), por ello la utilizamos como testigo positivo en varios de los experimentos de este trabajo.

Considerando todo lo antes expuesto, postulamos para este trabajo la siguiente hipótesis:

#### **HIPOTESIS.**

*Entamoeba histolytica* tiene una actividad citolítica dependiente del potencial de óxido-reducción.

#### **OBJETIVOS.**

- 1) Analizar el efecto del potencial de óxido-reducción sobre la actividad citolítica de *Entamoeba histolytica* cultivada axenicamente.
- 2) Caracterizar la actividad citolítica amibiana dependiente del potencial de óxido-reducción.
- 3) Establecer las diferencias con otras citolisinas amibianas.

## SECUENCIA DEL TRABAJO EXPERIMENTAL.

Para la realización de este trabajo, primero se montó el método para cuantificar el efecto citolítico de los extractos amibianos sobre los cultivos celulares de células CHO. El cual consistió en determinar el número total de células y el porcentaje de viabilidad de los cultivos tratados con respecto a cultivos testigos no tratados. Posteriormente de haber montado el modelo de cuenta total y viabilidad celular, se analizaron diferentes aspectos de la actividad citolítica amibiana, los cuales fueron los siguientes: a) dependencia del  $Eh^{\circ}$ ; b) distribución subcelular de la actividad; c) efecto del pH; d) efecto de la preincubación a  $36^{\circ}C$  y a temperatura de ebullición por tiempos variables; e) efecto de ciclos de congelación-descongelación; f) dependencia de grupos -SH; y g) efecto del  $Eh^{\circ}$  sobre la actividad fosfolipásica.

### III. MATERIALES.

#### A. Material Biológico.

Cultivos amibianos axénicos de *E. histolytica* cepa HM38. La cepa fue aislada de un caso de disentería amibiana en la ciudad de México por De la Torre (74) y ha sido mantenida en cultivo en nuestro laboratorio por 7 años en medio PEHPS (57).

Línea celular de ovario de hamster chino (CHO), auxótrofa de prolina. Es una población clonal, originada de la clona BC1, que obtuvo Martínez-Rodríguez (75) a partir de la cepa CCL61 (American Type Culture Collection, Maryland, USA). Puck et al aislaron la cepa original en 1958 (76). Es muy sensible a la actividad citolítica de extractos amibianos (34,37) y se ha mantenido viable en nuestro laboratorio por mas de 8 años en medio McCoy.

#### B. Preparación del medio de cultivo McCoy.

Las concentraciones de las soluciones madre se indican con un número seguido de una X que representa su concentración respecto a la solución de trabajo o solución 1X. Las soluciones fueron elaboradas con agua desionizada (4.0 MΩ desionizador Synbron/Barstead Co. Div. of Synbro Corporation, Boston, MA., USA.).

#### PREPARACION DE MEDIO BASAL McCoy (solución de trabajo 1X).

Se disolvieron 12 g de medio en polvo McCoy 5A modificado en 800 ml de agua desionizada, añadiendo 2.2 g de  $\text{NaHCO}_3$  y 10 ml de la solución de antibióticos 100X. El pH se ajustó a 7.0 y se

aforó a 1000 ml. La solución fue esterilizada por filtración a través de membranas de nitrocelulosa HAWP, poros de  $0.22\ \mu$  (Millipore Corporation, Bedford, MA., USA), distribuyendo el medio en volúmenes de 85 ml en botellas estériles de borosilicato con tapón de rosca. El medio fue incubado por una semana a  $36^{\circ}\text{C}$  para probar su esterilidad y luego se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### SOLUCION DE ANTIBIOTICOS (100X).

Penicilina G-sódica 200,000 U.I. y sulfato de estreptomina 0.5 g. Los componentes se disolvieron en 100 ml de agua desionizada. La solución se esterilizó por filtración y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 10 ml en tubos estériles con tapón de rosca 16 X 100 mm, Pyrex.

#### PREPARACION Y ALMACENAMIENTO DEL MEDIO COMPLETO.

El medio McCoy quedó completo al añadirle asépticamente 15 ml de suero de ternera a botellas con 85 ml de medio basal (solución de trabajo 1X); se usó inmediatamente o se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### C. Preparación del medio de cultivo PEHPS.

##### MEDIO BASAL PEHPS.

Fue desarrollado en nuestro laboratorio (57). La composición del medio es la siguiente: extracto de hígado de res y páncreas de res y de cerdo (EHP) 125 ml; peptona de caseína 5.0 g; glucosa 3.0 g; L-cisteína 0.5 g; ácido ascórbico 0.1 g; NaCl 0.2 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g. Los componentes se mezclan y se disuelven en los 125 ml de EHP y se le agregan 300 ml de agua desionizada.

El pH se ajusta a 7.0 con NaOH 10 N y se afora a 500 ml con agua desionizada. La osmolaridad se ajusta con NaCl en cada nuevo lote de EHP a  $300 \pm 10$  mOsm. El medio se distribuyó en alícuotas de 10 ml en tubos para cultivo de 16 X 125 mm, con tapón de rosca (Pyrex o Kimax, Mty, N.L. Mex.), o de 350 ml en frascos para cultivo en suspensión de 500 ml ("spinners", Bellco Glass Inc. Vineland, NJ, USA). Se esterilizó el medio en autoclave por 15 minutos a 15 lb de presión por pulgada cuadrada con los tapones flojos, que se apretaron después, estando los recipientes todavía calientes. El medio se almacenó a temperatura ambiente.

#### MEDIO COMPLETO PEHPS.

A los tubos con 10 ml de medio basal PEHP se le añadió asepticamente 1 ml de suero bovino descomplementado, o 35 ml a los spinners con 350 ml de medio.

#### D. Suero bovino y suero de ternera.

El suero se obtuvo de sangre colectada en el rastro de la ciudad el cual se pasó por una serie de filtros HAWP Millipore de  $10 \mu$  a  $0.22 \mu$ . Finalmente fue esterilizado por filtración a través de membranas HAWP con poros de  $0.22 \mu$ , distribuyéndolo en volúmenes de 40 o 100 ml en botellas estériles de borosilicato con tapón de rosca. Después fue descomplementado por calentamiento a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 min. De cada botella se sembró 1 ml de suero en 10 ml de medio PEHPS y se incubó por una semana para comprobar su esterilidad, luego fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## E. Composición y preparación de las soluciones.

### TRIPSINA AL 2.5%.

Se disolvieron 2.5 g de tripsina 1:250 Difco en 100 ml de agua desionizada estéril y se agitó suavemente toda la noche a 4°C con un agitador magnético. La solución fue filtrada por papel Whatman No. 1 en un embudo Buchner y luego esterilizada por filtración y almacenada a -20°C, en alícuotas de 10 ml.

### TRIPSINA AL 0.25%.

Se mezclaron 10 ml de tripsina al 2.5% en un vaso de precipitado con 0.6 ml de rojo de fenol al 1%, 1 ml de la solución de antibióticos (100X) y 90 ml de TD. Enseguida se esterilizó la solución por filtración y se almacenó a -20°C en porciones de 5 ml. Se incubó un tubo de cada lote, elegido al azar, por tres días a 36°C para comprobar su esterilidad.

### SOLUCION DE ROJO DE FENOL AL 1%.

Se disolvió 1.0 g de colorante en 6 ml de NaOH 1N y se aforó a 100 ml con agua desionizada. La solución fue filtrada en papel Whatman No. 1 y luego almacenada a -20°C en un frasco de borosilicato con tapón de rosca.

### AMORTIGUADOR DE pH ISOTONICO DE TRIS (TD).

NaCl 8 g; KCl 3.75 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 g; trizma base 3 g.

Los componentes se disolvieron en 90 ml de agua desionizada, se les añadió 30 ml de HCl 1N, y se aforó su volumen a 1,000 ml con agua desionizada. Se esterilizó en autoclave y se distribuyó en alícuotas de 100 ml, en botellas con tapón de rosca, almacenándose

a temperatura ambiente.

SOLUCION SALINA AMORTIGUADA CON FOSFATOS (PBS, por sus siglas en ingles: Phosphate Buffer Saline).

NaCl 6.5 g;  $K_2HPO_4$  2.8 g;  $KH_2PO_4$  0.5 g.

Los componentes se disolvieron en 100 ml de agua desionizada, ajustando el pH a 7.4-7.5 con NaOH 10N, se esterilizó la solución en autoclave y se almacenó en alícuotas de 100 ml a temperatura ambiente.

SOLUCION SALINA BALANCEADA DE HANK (SSB) 1X.

$CaCl_2$  0.7 g; glucosa 1.0 g; NaCl 7.2 g; KCl 0.4 g;  $MgSO_4$  0.2 g; Trizma base 0.12 g.

Todos los componentes fueron mezclados y disueltos en agua desionizada. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10N. La solución se aforó a 1000 ml y la osmolaridad fue ajustada a  $300 \pm 10$  mOsm. Se esterilizó por filtración, distribuyéndola en volúmenes de 50 ml en frascos con tapón de rosca y se usó inmediatamente o se almacenó a  $-20^\circ C$ .

SSB 1X CON MODIFICACIONES.

La solución base para todos los experimentos de actividad citolítica fue la SSB. Para cada serie de experimentos en los cuales se probaron diferentes sustancias y su efecto sobre la actividad citolítica, se mezclaron y disolvieron las cantidades del compuesto a probar en SSB 1X, para obtener las concentraciones indicadas en cada experimento en particular. En los casos en que se preparó una solución madre y a partir de ella se hicieron



diluciones para obtener la concentración deseada, todas las diluciones se hicieron también en SSB 1X. A cada una de estas soluciones, se les ajustó nuevamente el pH, se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20°C.

ACIDO  $\alpha$  [ $^{14}\text{C}$ ]AMINO ISOBUTIRICO ([ $^{14}\text{C}$ ]AIB).

[ $^{14}\text{C}$ ]AIB 1  $\mu\text{Ci/ml}$  (2X).

En un tubo de polipropileno estéril para cultivo (Falcon Division of Becton Dickinson and Company, Oxnard, CA, USA) conteniendo 6.337 ml de SSB 1X, se depositaron en condiciones asépticas 65  $\mu\text{l}$  [ $^{14}\text{C}$ ]AIB (53.2 mCi/mmol) con 65  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.01N y se almacenó la solución a -20°C.

[ $^{14}\text{C}$ ]AIB 0.5  $\mu\text{Ci/ml}$ .

Inmediatamente antes de cada experimento se mezcló, en condiciones asépticas, un volumen de [ $^{14}\text{C}$ ]AIB 2X con un volumen de SSB 1X.

#### F. Origen de los reactivos.

1. De Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, USA): ácido ascórbico, azida de sodio, azocaseína, azul de tripano, cistina, L-cisteína, dodecil sulfato de sodio, iodoacetamida, fosfolipasa de veneno de abeja, glicina, glucosa, estreptolisina O (SLO), seroalbúmina bovina (fracción V), reactivo de Folin Ciocalteu, trizma base, Tween 80. 2. De Merck (Alemania): 2,5 difeniloxazol (PPO), rojo de fenol; de Merck de México: sulfato de magnesio,

tolueno. 3. De Reactivos Monterrey: hidróxido de sodio, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de potasio, cloruro de sodio ácido clorhídrico, dicromato de potasio, ácido sulfúrico, cloruro de calcio. 4. De Bioxón de México: peptona de caseína. 6. De Lakeside S.A. (México): penicilina, sulfato de estreptomicina. 5. De J.T. Baker de México: bicarbonato de sodio, peróxido de hidrógeno. 7. De Gibco Laboratories (Gran Island, N.Y., USA): medio McCoy. 8. De Difco Laboratories (Detroit, Michigan, USA): tripsina. 9. De Técnica Química S.A. (México): cloruro de potasio, fosfato dibásico de potasio. 10. De Sigma de México: Tritón X-100. 11. De New England Nuclear (Boston, MA, USA): ácido  $\alpha$ [ $^{14}\text{C}$ ] amino isobutírico. 12. De Calbiochem: ditiotreitól. 13. De Mallinckrodt: cloruro de mercurio. 14. De BBL: agar. 15. El extracto de hígado y páncreas, el suero de bovino y el suero de ternera fueron procesados en el laboratorio de la División de Biología Celular (UNIBIN-IMSS) (57).

#### IV. METODOS.

##### A. Cultivo de células de la línea CHO.

###### RESIEMBRA Y MANTENIMIENTO.

El medio de cultivo se retiró asépticamente por succión de las botellas de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon, CA, USA) donde estaban creciendo las células. Se le añadió 1 ml de tripsina 0.25% y se incubaron los cultivos por 5 min a 36°C. Después La suspensión de células fue transferida a tubos cónicos, graduados con tapón de rosca. Los cultivos se lavaron dos veces con SSE centrifugando a 600 Xg por 5 min (centrifuga DPR 6000, cabezal 289, Damon IEC Div., NY, USA). Se resuspendió el sedimento celular con 5 ml de medio fresco y se contaron las células en un hematímetro (American Optical, Scientific Instruments Div., NY, USA). Se sembraron  $1 \times 10^3$  células por ml en botellas nuevas, a las cuales se les añadió 4 ml de medio McCoy completo y se incubaron a 36°C, en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%.

La cepa de referencia fue mantenida resemebrando las células a dos botellas de 25 cm<sup>2</sup> cada siete días . Los cultivos de la resiembra anterior se conservaron hasta comprobar el crecimiento y la ausencia de contaminación en los cultivos recientes.

###### CRIOPRESERVACION DE LAS CELULAS.

Las células se cosecharon en tubos cónicos graduados como se describió anteriormente. El sedimento celular se resuspendió en un volumen de medio McCoy completo con 10% de dimetilsulfóxido y

se ajustó la suspensión celular a una concentración de  $1-2 \times 10^6$  células por mililitro. Las células fueron colocadas en tubos estériles de polipropileno de 2 ml de capacidad (A/S Nunc, CA, USA) y congeladas sucesivamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 2-3 h, a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 2-3 h y por último donde se almacenaron a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido.

Para la descongelación se tomó un tubo con células congeladas y se pasó directamente a  $36^{\circ}\text{C}$  en baño maría para descongelado rápido. El contenido fue colocado en dos botellas de  $25 \text{ cm}^2$  y se le agregaron 4 ml de medio McCoy completo. A las cuatro horas se cambió el medio de cultivo para eliminar el dimetilsulfóxido.

#### LIMPIEZA DE LA INCUBADORA DE $\text{CO}_2$ .

La limpieza de la incubadora se realiza cuando menos una vez por mes, primero con SDS 1% y después con etanol comercial al 96%. Las charolas se lavan por separado con SDS 1% y se esterilizan en el horno a  $200^{\circ}\text{C}$  por 3 h.

#### B. Cultivos amibianos axénicos.

##### TRATAMIENTO DEL MATERIAL PARA CULTIVO.

El tratamiento del material y los métodos de cultivo, resiembra y cosecha de amibas en tubos de  $16 \times 125 \text{ mm}$  están basados en los descritos por López-Revilla y Rodríguez-Báez (77).

El medio PEHPS y las técnicas de cultivos amibianos en suspensión se desarrollaron en el laboratorio de la División de Biología Celular, UNIBIN-IMSS (57,37).

#### RESIEMBRA Y COSECHA.

La cepa HM38 de *E. histolytica* se mantuvo en cultivo incubándola a 36°C (incubadora National Heinicke Co. OR., USA). Antes de cada resiembra se observaron los cultivos en un microscopio invertido (Biovert, Reichert, Austria) para comprobar el buen estado morfológico y la movilidad de las amibas. El mejor cultivo fue colocado en agua-hielo por 10 min, se determinó la concentración amibiana en un hematímetro y se inoculó  $1 \times 10^3$  trofozoítos por ml a cada uno de otros tres tubos con medio PEHPS fresco. Los cultivos de la penúltima resiembra se conservaron hasta comprobar el crecimiento de las amibas y la ausencia de contaminación en los cultivos recién sembrados. Los cultivos se resembraron cada 4 días, en fase log de crecimiento. Los cultivos amibianos se cosecharon mediante enfriamiento en agua-hielo por 10 min, después se centrifugaron a 600 Xg por 10 min a 4°C y luego se lavaron con SSB.

#### CULTIVOS MASIVOS.

Los cultivos masivos de *E. histolytica* se obtuvieron utilizando frascos para cultivo en suspensión (spinners) de 500 ml de capacidad. El inóculo fue de  $3 \times 10^3$  amibas por ml en 350 ml de medio PEHP y 35 ml de suero de bovino descomplementado. Se incubaron por 2 días a 36°C manteniendo los cultivos estáticos para después pasar a incubarlos a baño maría a 36°C, agitándolos con un agitador magnético, para mantener en suspensión los

trofozoítos por 3-4 días.

Terminado el tiempo de incubación, se procedió a cosechar los trofozoítos mediante inmersión del frasco en agua-hielo por 10 min. Se centrifugó el medio en botellas de polipropileno con tapón de rosca de 250 ml (Damon IEC Div. MA., USA) a 600 Xg por 10 min a 4°C y se lavaron con dos volúmenes de SSB.

### **C. Obtención de extractos amibianos.**

Los trofozoítos se cosecharon en la fase logarítmica tardía de crecimiento, centrifugando a 1200 Xg por 10 min a 4°C y lavados con SSB. El sedimento de amibas se resuspendió con dos volúmenes de SSB y se homogenizaron con 50 golpes de un homogenizador tipo Elvehjem-Potter. Después de este tratamiento no se observaron trofozoítos enteros. El producto resultante es el extracto total (ET) (Fig. 1).

Este extracto total amibiano se centrifugó a 135 Xg por 15 min y se obtuvo un sedimento, la fracción nuclear (N) y el sobrenadante correspondiente, que se centrifugó a 30,000 Xg por 15 min. El sobrenadante de esta última centrifugación correspondió a la fracción S30 y el sedimento a la fracción P30, la cual se resuspendió con dos volúmenes de SSB. Durante este proceso todas las muestras se manipularon a 4°C. La concentración de proteínas en los extractos amibianos fue determinada mediante el método de Lowry et al (78).

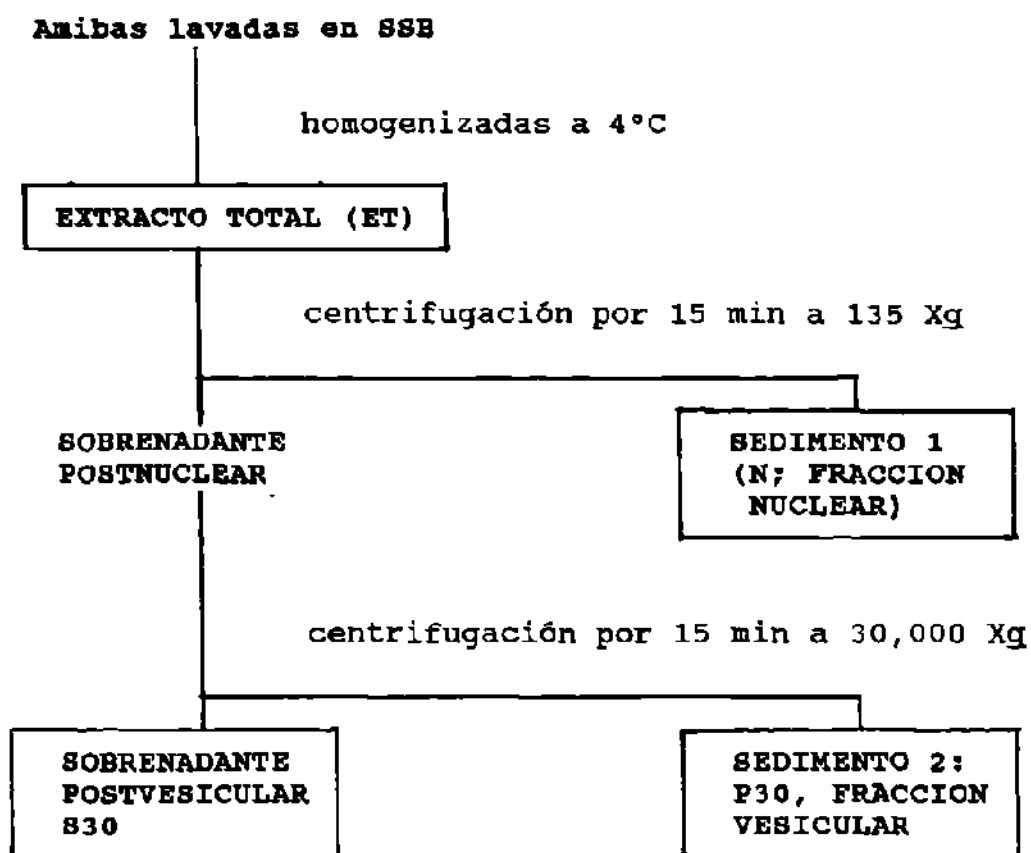


Fig. 1. Diagrama de flujo del fraccionamiento de los extractos amibianos

**D. Marcaje de los cultivos de células CHO con [ $^{14}\text{C}$ ]AIB.**

En placas para microensayo (Microtest, Falcon, TEX, USA), con 96 pozos de fondo plano, con capacidad de 250  $\mu\text{l}$ . Se sembraron  $1.5 \times 10^4$  células por pozo (50% de confluencia) en 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo McCoy completo. Las placas se cubrieron con películas transparentes (Film, Pressure Sensitive, Microtest, Falcon, TEX, USA) y se incubaron por 20-24 h a  $36^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%, para que se formaran las monocapas confluentes. Enseguida se aspiró el medio de cultivo con una pipeta Pasteur, y se lavaron tres veces los cultivos con 100  $\mu\text{l}$  de SSB adicionado con 10 mg/ml de seroalbúmina bovina (SAB). Los cultivos se reincubaron por 1 h, en SSB con SAB para después aspirar el medio, lavar los cultivos tres veces con SSB y añadir a cada pozo 25  $\mu\text{l}$  de SSB adicionado con 0.5  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^{14}\text{C}$ ]AIB y nuevamente reincubar los cultivos por 4 h para que las células captasen el marcador radiactivo. Enseguida se lavaron los cultivos 5 veces con SSB, para eliminar el marcador no captado y se procedió al ensayo.

**E. Cuantificación de la actividad citolítica por el método de cuenta total y determinación de viabilidad por la exclusión del azul de tripano.**

A un cultivo de células CHO en confluencia, se le agregó 1 ml de tripsina 0.25% y se incubaron por 5 min a  $36^\circ\text{C}$ . Se obtuvo la suspensión celular que se lavó dos veces con SSB, centrifugando por 5 min a 300 Xg. El paquete celular se resuspendió con SSB,



ajustando la densidad celular a  $6 \times 10^5$  células/ml.

Se utilizaron placas para microensayo con 96 pozos de fondo plano, preincubadas por 2 h a  $36^\circ\text{C}$  o toda la noche a  $4^\circ\text{C}$  con 200  $\mu\text{l}$  por pozo de SSB adicionado con 10 mg/ml de SAB y lavadas dos veces con 200  $\mu\text{l}$  de SSB, esto con el fin de evitar la adherencia de las células al substrato y mantenerlas en suspensión. Se distribuyeron 25  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular por pozo e inmediatamente antes del ensayo se añadieron 25  $\mu\text{l}$  de SSB o SSB mas el regulador de potencial de óxido-reducción. Posteriormente se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de SSB o de la mezcla con el agente citolítico a probar (Fig. 2).

Después de 8 min o 30 min de incubación se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de azul de tripano al 0.1 % en SSB, para resuspender suavemente con la pipeta de repetición y tomar una alícuota para determinar el número total de células en una cámara Neubauer y el porcentaje de viabilidad para los cultivos testigos y los tratados por la exclusión del azul de tripano. Como algunas células se lisan completamente desde los 8 min, durante el tiempo de incubación, el efecto total fue definido por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de citólisis} = \frac{\text{No. de células en cultivos tratados} - \text{No. equivalente al \% de células no excluyentes del azul de tripano.}}{\text{No. de células viables en cultivos testigos.}}$$

Los valores de porcentaje de citólisis fueron normalizados tomando como base la actividad citolítica producida por la

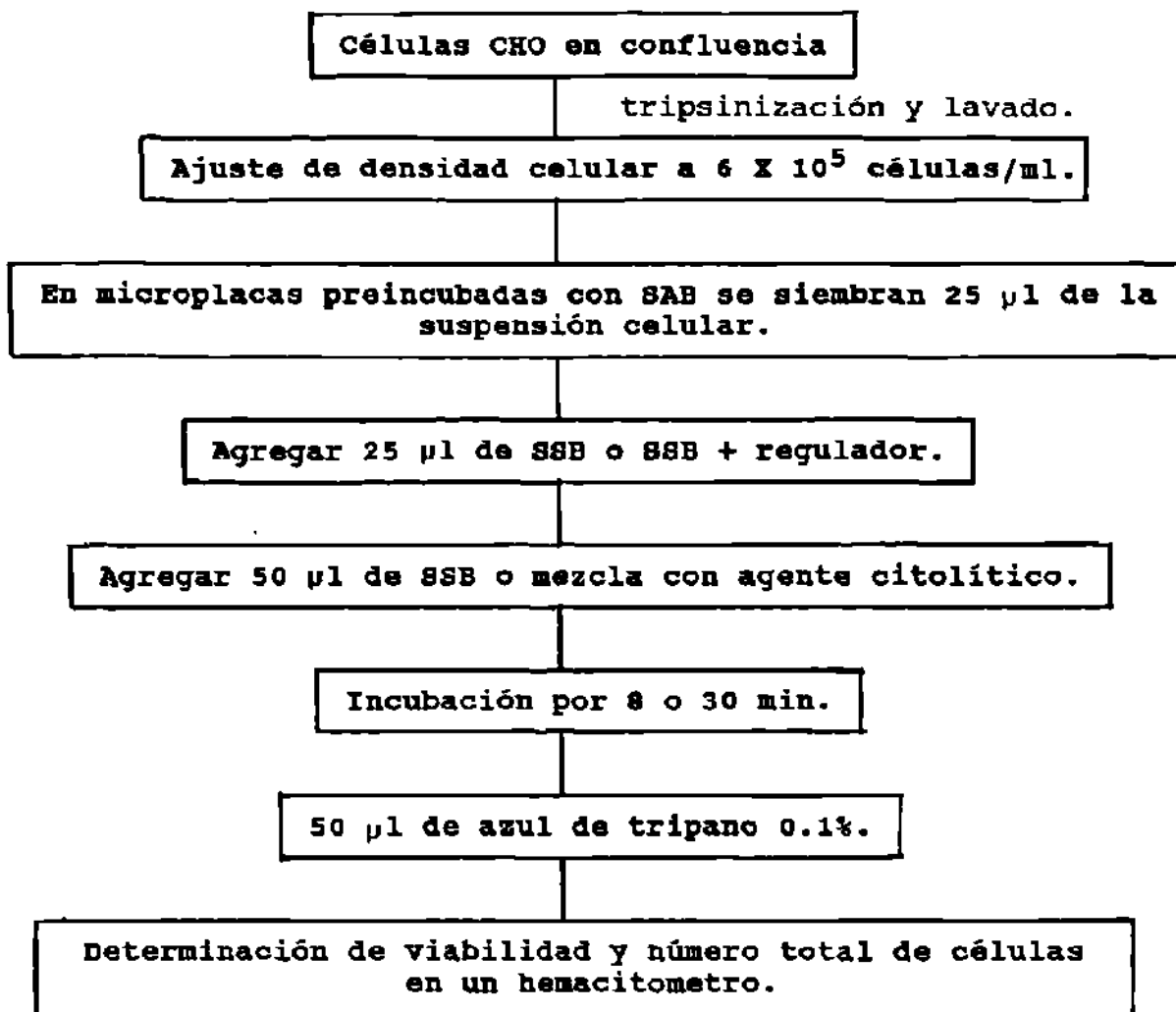


Fig. 2. Diagrama de flujo del modelo de cuenta total y viabilidad.

fracción subcelular amibiana utilizada en cada ensayo en particular. Para los ensayos donde se probó el efecto del potencial de óxido-reducción, el valor base que se tomó como la unidad, fue el porcentaje de citólisis obtenido con la fracción probada sin reguladores del potencial. Para los ensayos posteriores, el valor tomado como la unidad para normalizar los valores fue el porcentaje que correspondió a la citólisis producida en el potencial donde se presentó la máxima actividad (-150 mV).

Se aplicó la prueba "t" de student para comparar los valores obtenidos de los cultivos testigos contra los de los cultivos tratados. La diferencia entre las dos poblaciones fue significativa ( $p < 0.05$ ) y por lo tanto los valores de actividad citolítica determinados son confiables.

#### **F. Validación del modelo de cuenta total y determinación de viabilidad por la exclusión del azul de tripano.**

El modelo anteriormente descrito para cuantificar actividad citolítica, fue comparado con el modelo descrito por Thelestam y Möllby para ver el efecto de citolisinas que producen lesiones membranales muy finas (73) y que durante mi tesis de Maestría adapté para determinar el efecto citolítico de la fracción P30 después de tiempos muy breves de contacto (de 15 seg a 8 min) sobre células CHO (37).

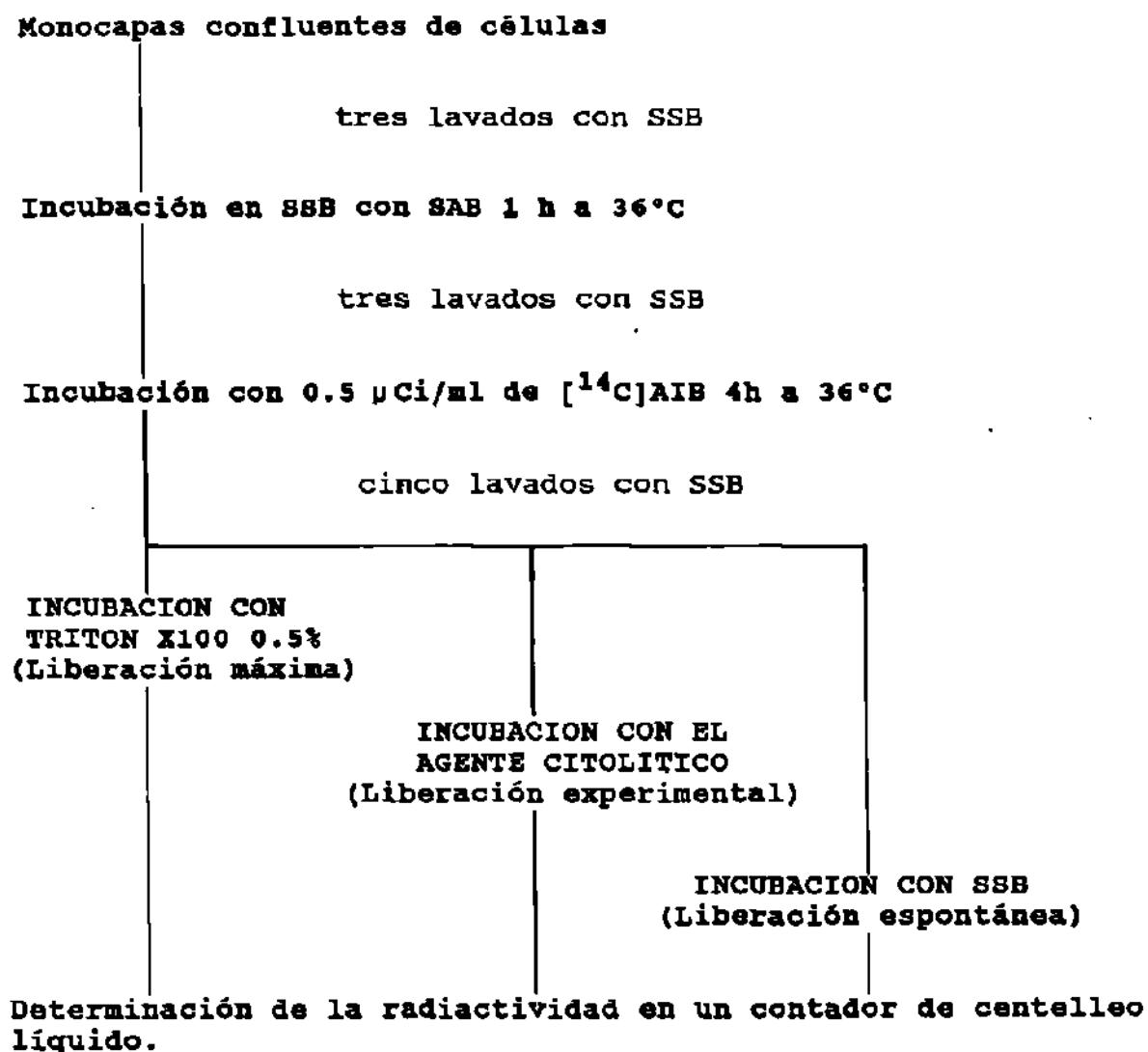


Fig. 3. Diagrama de flujo del modelo del [<sup>14</sup>C]AIB.

Este método se basa en determinar el porcentaje de citólisis como una función de la cantidad liberada al medio extracelular del [ $^{14}\text{C}$ ]AIB por células premarcadas e incubadas con la fracción amibiana (Fig.3). Para efectuar este análisis se ajustó la concentración de proteínas en el extracto amibiano a 0.4 mg/ml como máximo, para comparar los dos modelos, porque una mayor cantidad de proteínas provoca una interferencia de la luminiscencia (apagamiento) en el conteo de la radiactividad (37). El porcentaje de liberación del marcador se calculó mediante la ecuación:

$$\%LES = \frac{LEX - LE}{LM - LE} \times 100$$

Donde %LES significa el porcentaje de liberación específica del marcador y es equivalente al por ciento de citólisis. LEX es la liberación experimental, que corresponde a la liberación del marcador al medio extracelular por el efecto de un agente citolítico dado; LE corresponde a la liberación espontánea, detectada en cultivos testigos no tratados y LM corresponde a la liberación máxima, equivalente a la captación total del marcador, determinada después de lizar los cultivos celulares con Tritón X-100 al 0.5%. Los resultados obtenidos por los dos modelos para medir la actividad citolítica se analizaron estadísticamente por la prueba "t" de student.

### G. Determinación del potencial de óxido-reducción ( $Eh^\circ$ ).

El potencial de óxido-reducción de las soluciones a usar para los ensayos de actividad citolítica y de actividad fosfolipásica, fueron medidos en un potenciómetro (Corning digital 109, Corning Scientific Instruments, Medfield, MA, USA) con un electrodo combinado de platino-plata/cloruro de plata (Fisher E-11, Fisher Scientific Company, USA). Como estándar se elaboró una solución de cistina ( $2.18 \times 10^{-4}$  M) y cisteína (0.1 M) en agua, a pH 7.0. Esta solución dio un  $Eh^\circ$  de  $-265 \pm 20$  mV.

### H. Efecto del potencial de óxido-reducción sobre la actividad citolítica.

En el modelo descrito para medir actividad citolítica se determinó el efecto del  $Eh^\circ$  de la mezcla de ensayo sobre la actividad citolítica de estreptolisina-O o de P30. El  $Eh^\circ$  de dichas mezclas fue regulado con cantidades variables de ditiotreitól (DTT, entre 0.001 mM y 1.0 mM), con los cuales se obtuvieron  $Eh^\circ$  entre -70 mV a -183 mV; o de peróxido de hidrógeno (entre 0.5 mM y 50 mM) para obtener  $Eh^\circ$  entre +97 mV a +238 mV. La solución salina sin reguladores tuvo un  $Eh^\circ$  de +42 mV.

Se definió arbitrariamente al promedio de actividad citolítica de P30 (15.61%) en mezclas de ensayo con esta última solución como 1.00 para normalizar los valores de todos los experimentos donde se analizó el efecto del  $Eh^\circ$ .

Como testigo para este experimento se usó una de las

citolisinas lábiles al oxígeno mejor caracterizadas, la estreptolisina O. Se uso una concentración de 40  $\mu\text{g}$  de proteínas totales en la mezcla de ensayo (4 mg/ml), que previamente se determinó como la cantidad de estreptolisina-O que produjo el 88% de citólisis, al titular la actividad citolítica en nuestro modelo de estudio. Para los ensayos de actividad citolítica de P30 la concentración final de proteínas se ajustó a 100  $\mu\text{g}$  totales (1 mg/ml).

#### **I. Distribución subcelular de la actividad citolítica dependiente del potencial de óxido-reducción.**

La actividad citolítica fué determinada en cada una de las fracciones amibianas que se obtuvieron (ET, N, P30, S30) cuantificando el porcentaje de muerte celular de los cultivos de células CHO después de 30 min de incubación con cantidades variables de las fracciones (entre 0.05 y 2 mg/ml de proteína total amibiana) en presencia de 0.4 mM de DTT. El porcentaje de muerte celular fué calculado por el método de cuenta total y viabilidad descrito anteriormente.

La actividad citolítica específica de cada fracción se obtuvo a partir de la parte lineal de cada relación gráfica.

#### **J. Determinación de la actividad fosfolipásica.**

El método para determinar actividad fosfolipásica utilizado aquí está basado en el de Habermann y Hardt (79). El ensayo se

realizó en cajas de petrí conteniendo gel de agar-yema de huevo (agar 0.6%; Tris 50 mM; azida de sodio 0.02%;  $\text{CaCl}_2$  1 mM; sobrenadante de yemas de huevo centrifugadas a 300 Xg 3% v/v; pH 7.95). Se hicieron doce pozos equidistantes de 3 mm de diámetro en cada caja, en ellos se colocaron las mezclas de ensayo para probar su actividad fosfolipásica y se incubó por 20 h a 36°C en una cámara húmeda. Después se midió el diámetro del halo transparente formado alrededor de cada pozo que correspondió a la hidrólisis de los fosfolípidos. El logaritmo del área en  $\text{mm}^2$  es una función lineal de la actividad fosfolipásica, expresada en miliunidades (mU) (46).

En los pozos usados como testigos se depositaron 10 mU de fosfolipasa de veneno de abeja. Una mU de fosfolipasa está definida como la cantidad de enzima que hidroliza 1 nmol de L- $\alpha$ -fosfatidilcolina por minuto (46). La cantidad de fosfolipasa usada produjo un área de hidrólisis promedio de 93.3  $\text{mm}^2$ . La actividad fosfolipásica de P30 se determinó colocando en cada pozo 10  $\mu\text{l}$  de P30 con una cantidad de proteínas de 10 mg/ml en SSB con NP-40 1% y pH 7.95 y procediendo de la misma manera que para la fosfolipasa de veneno de abeja.

#### **K. Efecto del potencial de óxido-reducción sobre la actividad fosfolipásica.**

Se procedió de la misma manera como se describe arriba para cuantificar la actividad fosfolipásica. Los reguladores de  $\text{Eh}^\circ$  se



agregaron a las soluciones con agar y yema de huevo usados para hacer los ensayos. En esta ocasión se utilizó como reductor DTT en concentraciones de 0.001 a 1.0 mM dando  $Eh^\circ$  entre -20 mV a -205 mV. Como oxidante se usó cloruro de mercurio ( $4 \times 10^{-6}$  M a  $4 \times 10^{-4}$  M) para obtener  $Eh^\circ$  entre +102 mV a +195 mV. Los valores obtenidos de mU de fosfolipasa se normalizaron tomando arbitrariamente como unidad a la actividad detectada en ausencia de agentes reguladores del potencial (+69 mV).

#### **L. Caracterización de la actividad citolítica dependiente del potencial de óxido-reducción.**

Toda la caracterización de la actividad citolítica se llevó a cabo en el modelo de cuenta total y viabilidad que se describe anteriormente, incubando los cultivos celulares con la fracción S30 por 30 min. Todas las soluciones de ensayo tuvieron una concentración final de 0.4 mM de DTT que da un  $Eh^\circ$  alrededor de -150 mV.

#### **EFEECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD CITOLITICA.**

Para analizar el efecto del pH sobre la actividad citolítica, la solución salina balanceada de Hank fué utilizada como solución base por haber sido la que se usó en los ensayos previos de citólisis, solo fueron cambiados los amortiguadores de pH, ya que en lugar de usar Tris, se utilizaron como reguladores de pH, el par de fosfatos para pH entre 5 y 8, mientras que para pH más

básicos se utilizó glicina. La osmolaridad de cada solución amortiguadora fué ajustada a  $300 \pm 10$  mOsm variando la cantidad de NaCl.

Las concentraciones de los reactivos amortiguadores para cada pH diferente fueron determinadas tomando como base las tablas de soluciones amortiguadoras (80). Las soluciones madre de amortiguadores (disueltas en solución salina) usadas fueron:

para fosfatos = Sol. A  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.066 M;

Sol. B  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.066 M.

para glicina = Sol. A Glicina 0.1 M en NaCl 0.1 N;

Sol. B NaOH 0.1 N.

#### EFFECTO DE LA PREINCUBACION A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CICLOS DE CONGELACION-DESCONGELACION SOBRE LA ACTIVIDAD.

Para esta serie experimental era necesario que las células se mantuvieran en buenas condiciones por períodos largos y ya preparadas para el ensayo. Por esta razón se buscó un medio que mantuviera a las células y que no tuviera componentes que pudieran interferir con el ensayo. El medio de cultivo McCoy sin suero fué el adecuado, ya que en él, las células se mantienen bien hasta por 24 h sin disminuir su viabilidad y el tiempo mayor que se utilizó en los ensayos fue de 7 h.

La fracción S30 fue sometida a los siguientes tratamientos antes de probarla sobre los cultivos celulares:

- 1) Preincubación a  $36^\circ\text{C}$  desde el tiempo 0 hasta 6 h.

- 2) Calentamiento a temperatura de ebullición de 0 a 18 min.
- 3) Ciclos de congelación-descongelación. La fracción S30 recién obtenida se sometió hasta 3 ciclos de congelación en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  y descongelación a  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### EFEECTO DE LA IODOACETAMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD CITOLITICA.

La iodoacetamida es un compuesto que produce carboximetilación de los grupos sulfhidrilos inhibiendo irreversiblemente la actividad de los compuestos con grupos  $-\text{SH}$  (81). Para probar su efecto sobre la actividad citolítica amibiana se incubó la S30 en presencia del inhibidor por 30 min a  $36^{\circ}\text{C}$  y luego se le agregó una cantidad de DTT suficiente (1 mM) para restablecer un potencial de  $-150$  mV, el cual es el punto de máxima actividad citolítica detectada. Posteriormente se analizó en el modelo de citólisis que ya se ha descrito. Las concentraciones finales de iodoacetamida utilizadas fueron de 1, 2 y 4 mM.

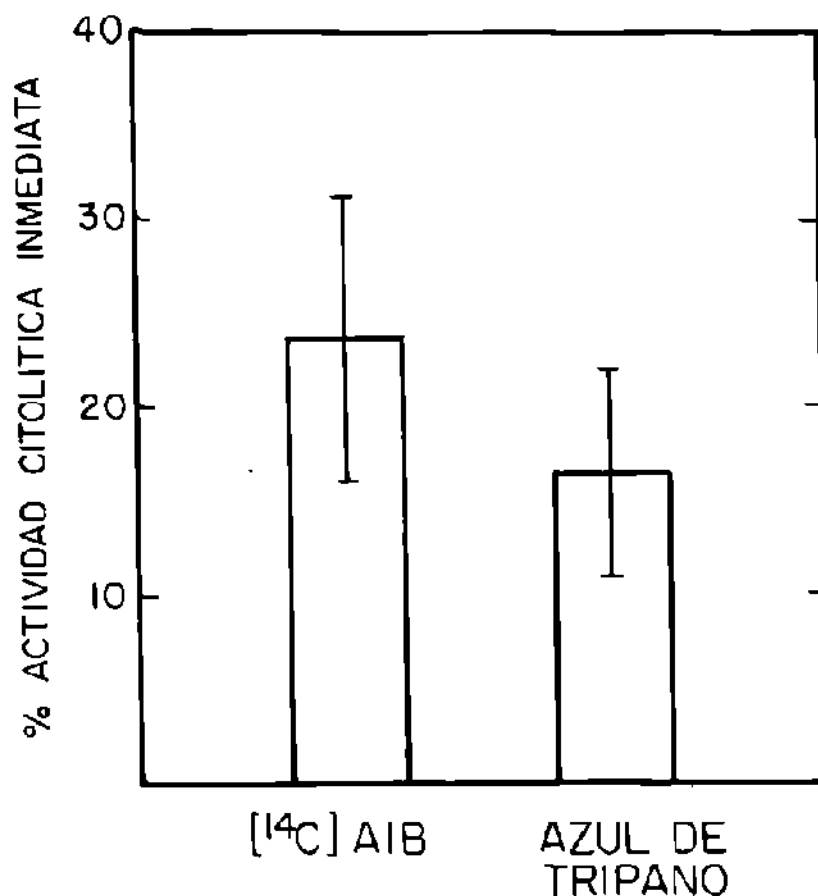
## V. RESULTADOS.

### A. Validación del modelo de cuenta total y determinación de viabilidad por la exclusión del azul de tripano.

Los extractos amibianos presentan actividad citolítica que puede ser determinada por cualquiera de los dos métodos que desarrollamos. Utilizando una concentración fija de P30 equivalente a 0.4 mg/ml se obtuvo a los 8 min de incubación una liberación de 23.61% del radioisótopo, el cual equivale al porcentaje de citólisis. Con el modelo de cuenta total y viabilidad se detectó un 16.52% de citólisis (Fig. 4). Al analizarlos estadísticamente no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los dos métodos. Por lo tanto, decidimos utilizar el segundo método para nuestros análisis porque es más rápido, más fácil de manejar, es confiable y menos costoso.

### B. Efecto del potencial de óxido-reducción sobre la actividad citolítica.

Como testigo en el modelo experimental del comportamiento de la actividad de una citolisina lábil al oxígeno, incubada con potenciales de óxido-reducción variables, se utilizó la estreptolisina-O. En los valores positivos de  $Eh^{\circ}$  no se presentó actividad de la estreptolisina-O y no es sino hasta cerca de -80 mV que empieza a detectarse su actividad, llegando a su máximo sobre los -200 mV (Fig. 5). Para la fracción amibiana se detectaron dos picos de actividad citolítica (Fig. 6). Uno de



**Fig. 4. Comparación de dos métodos para medir actividad citolítica.** La actividad citolítica fue cuantificada por la liberación del [<sup>14</sup>C]AIB de células premarcadas o mediante la cuenta total de las células más el número equivalente al porcentaje de células que no excluyen el colorante azul de tripano después de 8 min de incubación con una cantidad fija de P30 (0.4 mg/ml de proteínas). Los valores obtenidos son con respecto a cultivos testigos no tratados. No hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las medias de los valores de actividad citolítica obtenidos por los dos métodos. Los valores representan el promedio y ( $\pm$ ) desviación estándar de doce determinaciones.

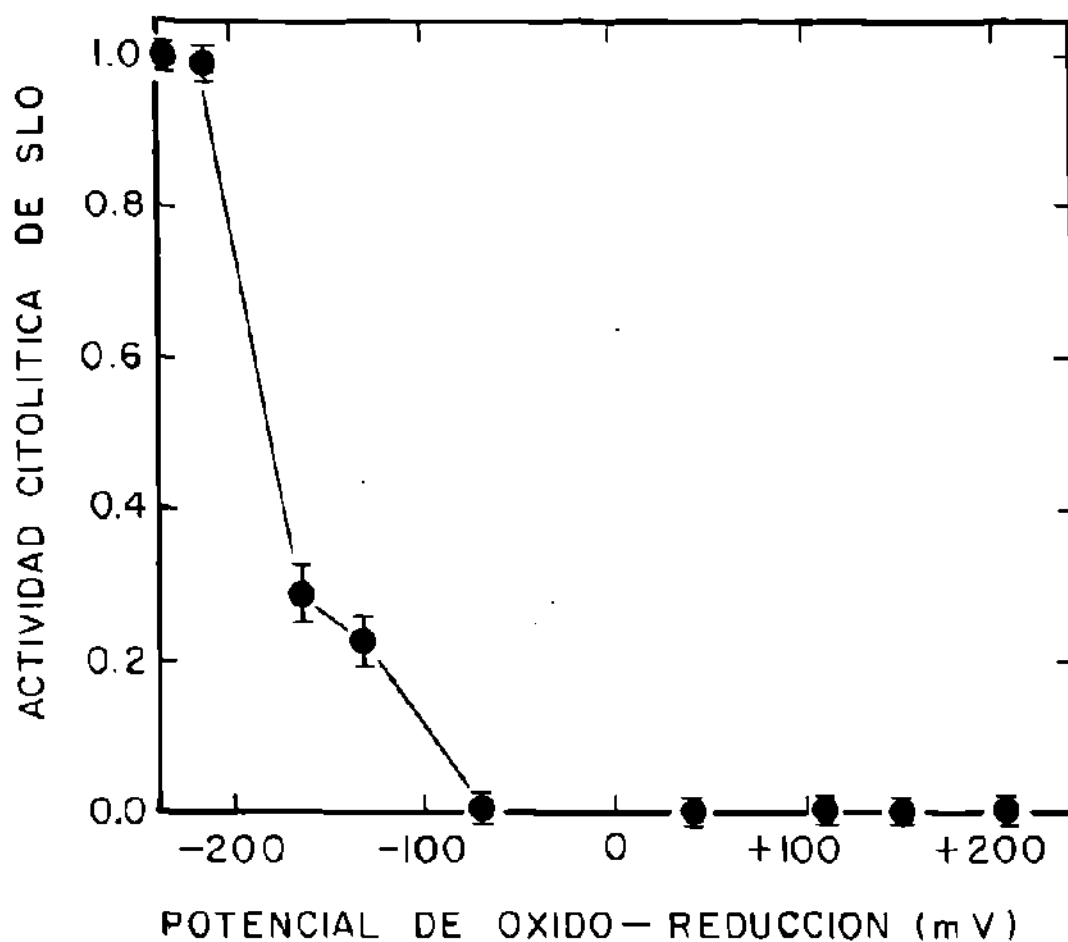
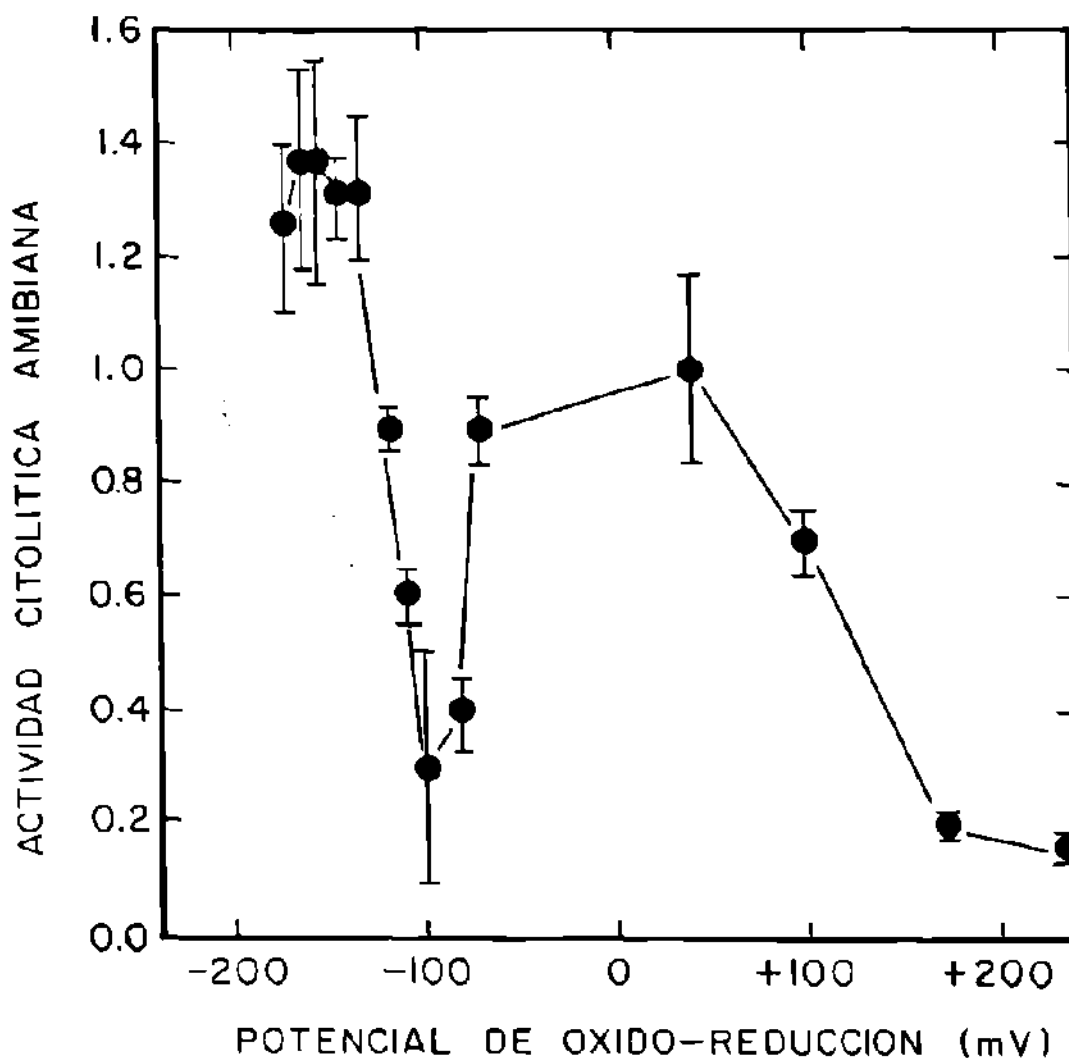


Fig. 5. Efecto del potencial de óxido-reducción sobre la actividad citolítica de SLO. Los cultivos celulares se incubaron por 8 min con una dosis fija de SLO equivalente a 40  $\mu$ g de proteína en las mezclas de ensayo. El  $Eh^\circ$  fue regulado por DTT ( $Eh^\circ$  negativos) o por  $H_2O_2$  ( $Eh^\circ$ ). Los valores se normalizaron tomando como unidad al porcentaje de citólisis más alto (89%). Cada símbolo representa el promedio y ( $\pm$ ) error estándar de seis determinaciones.



**Fig 6. Actividad citolítica ambiental dependiente del  $Eh^\circ$ .** Se determinó la actividad citolítica ambiental en cultivos celulares incubados por 8 min con una cantidad fija de P30 equivalente a 100  $\mu\text{g}$  de proteínas totales. El  $Eh^\circ$  fue regulado con DTT (potenciales negativos) o con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (potenciales positivos). Los valores de la actividad citolítica se normalizaron tomando como la unidad a la actividad detectada a +42 mV (equivalente a 15.61% de citólisis) Cada símbolo representa el promedio y ( $\pm$ ) error estándar de nueve determinaciones.

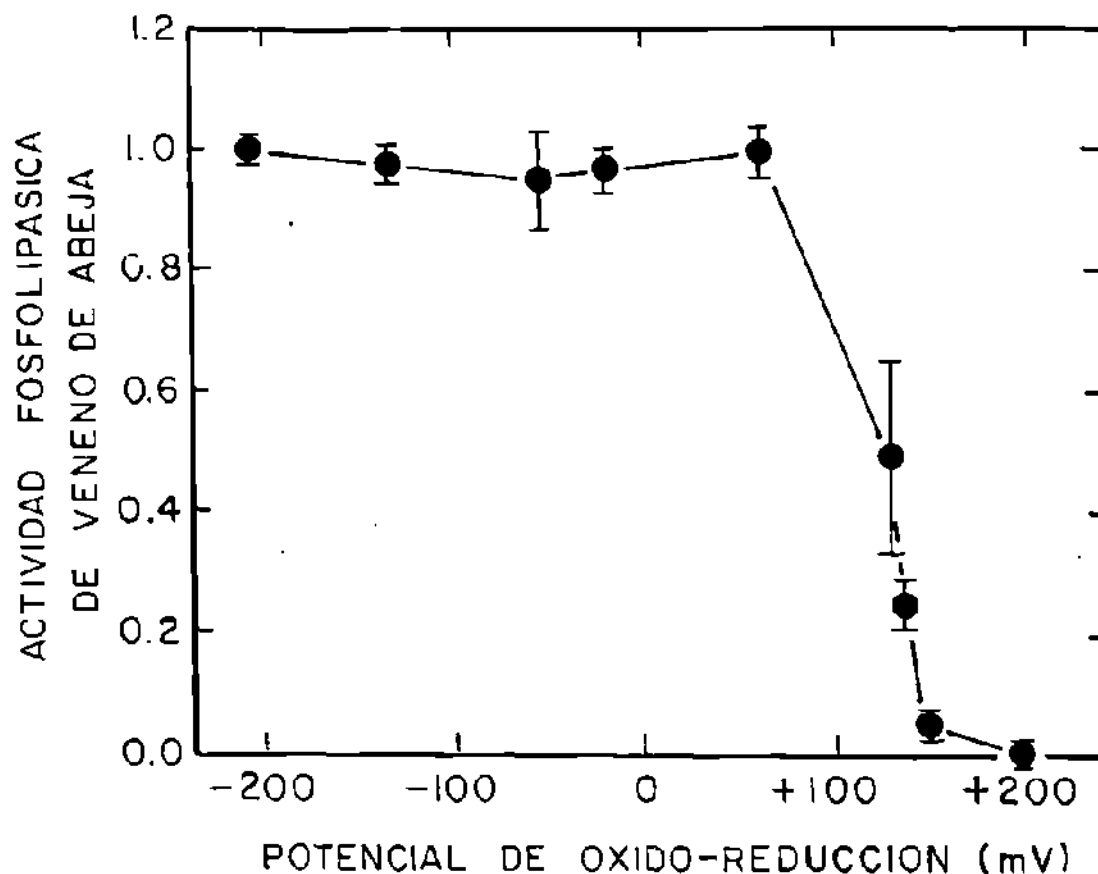
ellos a +42 mV, valor en el cual se detectó originalmente la actividad y el otro a -150 mV, la cual no se modificó significativamente desde los -130 mV hasta -180 mV. Los valores fueron normalizados tomando como unidad el porcentaje de muerte celular obtenido a +42 mV (correspondiente al 15.61% de citólisis). La actividad encontrada a -150 mV corresponde a 1.3 (20.34% de citólisis), 30% mayor que la actividad originalmente detectada.

### **C. Efecto del potencial de óxido-reducción sobre la actividad fosfolipásica.**

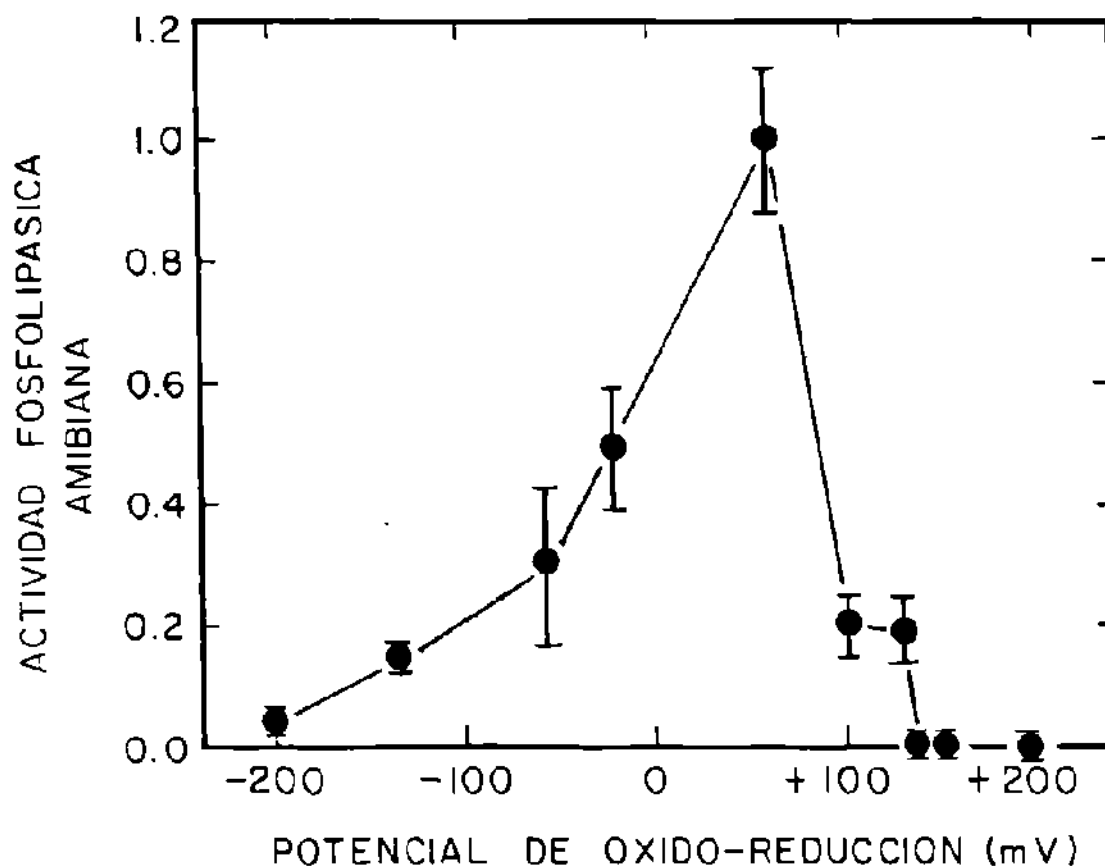
Como control fue utilizada fosfolipasa de veneno de abeja. Para normalizar los valores de mU de actividad fosfolipásica se tomó como la unidad al valor encontrado en ausencia de reguladores de  $Eh^\circ$  (+69 mV). El valor para la fosfolipasa de veneno de abeja fue de 233 mU y para P30 fue de  $2.05 \times 10^{-3}$  mU. A partir de este punto, la actividad fosfolipásica, tanto de veneno de abeja como la amibiana, disminuyó en función del incremento del grado de oxidación de las mezclas de ensayo (Fig. 7 y Fig. 8). En medios con +200 mV no se detectó actividad en ninguno de los dos casos.

En tanto, para el lado negativo del  $Eh^\circ$  se observó que la actividad de fosfolipasa de veneno de abeja se mantuvo al mismo nivel de actividad hasta al menos los -220 mV (Fig. 7), en cambio la actividad fosfolipásica amibiana disminuyó en función del grado de reducción del medio; a los -200 mV la actividad es casi nula (Fig. 8)





**Fig. 7. Efecto del  $Eh^\circ$  sobre la actividad fosfolipásica de veneno de abeja.** La actividad fosfolipásica se determinó como se describe en métodos. Los valores de la actividad se normalizaron tomando como la unidad a la actividad detectada en ausencia de reguladores de  $Eh^\circ$  (+69 mV) y que corresponde a 233 mU de actividad enzimática. El potencial se reguló con concentraciones variables de DTT ( $Eh^\circ$  negativos) o con  $HgCl_2$  ( $Eh^\circ$  positivos). Cada símbolo representa el promedio y ( $\pm$ ) error estándar de nueve determinaciones.



**Fig. 8. Efecto del  $Eh^\circ$  sobre la actividad fosfolipásica amibiana.** Se determinaron las mU de actividad fosfolipásica de P30 amibiana a diferentes potenciales y se normalizaron los valores tomando como la unidad a la actividad encontrada a +69 mV (sin reguladores de  $Eh^\circ$ ) que correspondió a  $2.05 \times 10^{-3}$  mU de actividad fosfolipásica. El  $Eh^\circ$  fue regulado agregando cantidades variables de DTT ( $Eh^\circ$  negativos) o  $HgCl_2$  ( $Eh^\circ$  positivos). Cada símbolo representa el promedio y ( $\pm$ ) error estándar de nueve determinaciones.

#### **D. Distribución subcelular de la actividad citolítica amibiana.**

Tanto el ET como cada una de las fracciones subcelulares analizadas tienen actividad citolítica. La cual tiene una relación directa con la cantidad de proteínas totales amibianas agregadas en el ensayo. Dicha relación correspondió a funciones lineales para todas las fracciones cuando se analizaron cantidades equivalentes entre 0.05 y 0.25 mg/ml de proteínas totales. La fracción subcelular con la mayor actividad específica fue S30 y luego en orden decreciente P30, ET y N (Tabla. 1) El valor tomado para determinar la actividad relativa fue el obtenido con P30, por ser la fracción en la cual se habían realizado todos los ensayos previos.

#### **E. Efecto del pH sobre la actividad citolítica.**

La actividad citolítica es dependiente del pH. Su óptimo de actividad se encuentra a pH neutro; el pico de actividad está en pH 7.0. A pH menores de 6 o mayores de 9 la actividad es nula (Fig. 9).

#### **F. Efecto de la preincubación a diferentes temperaturas y ciclos de congelación-descongelación sobre la actividad citolítica.**

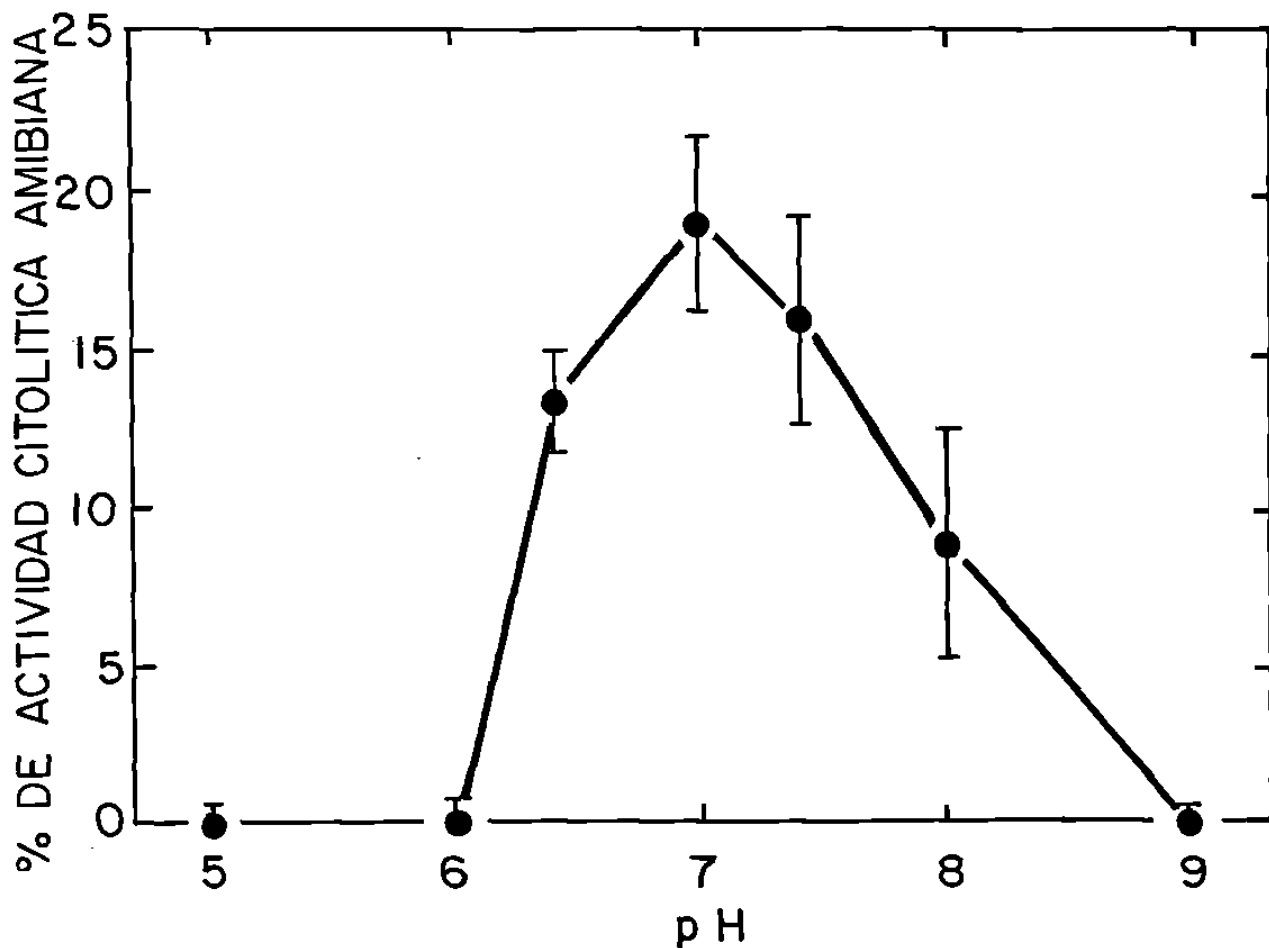
La actividad citolítica va disminuyendo en relación al tiempo de preincubación a 36°C (Fig. 10). Una hora de incubación a esta temperatura disminuye su potencia en un 50% y a las tres horas se ha perdido por completo.

TABLA No. 1

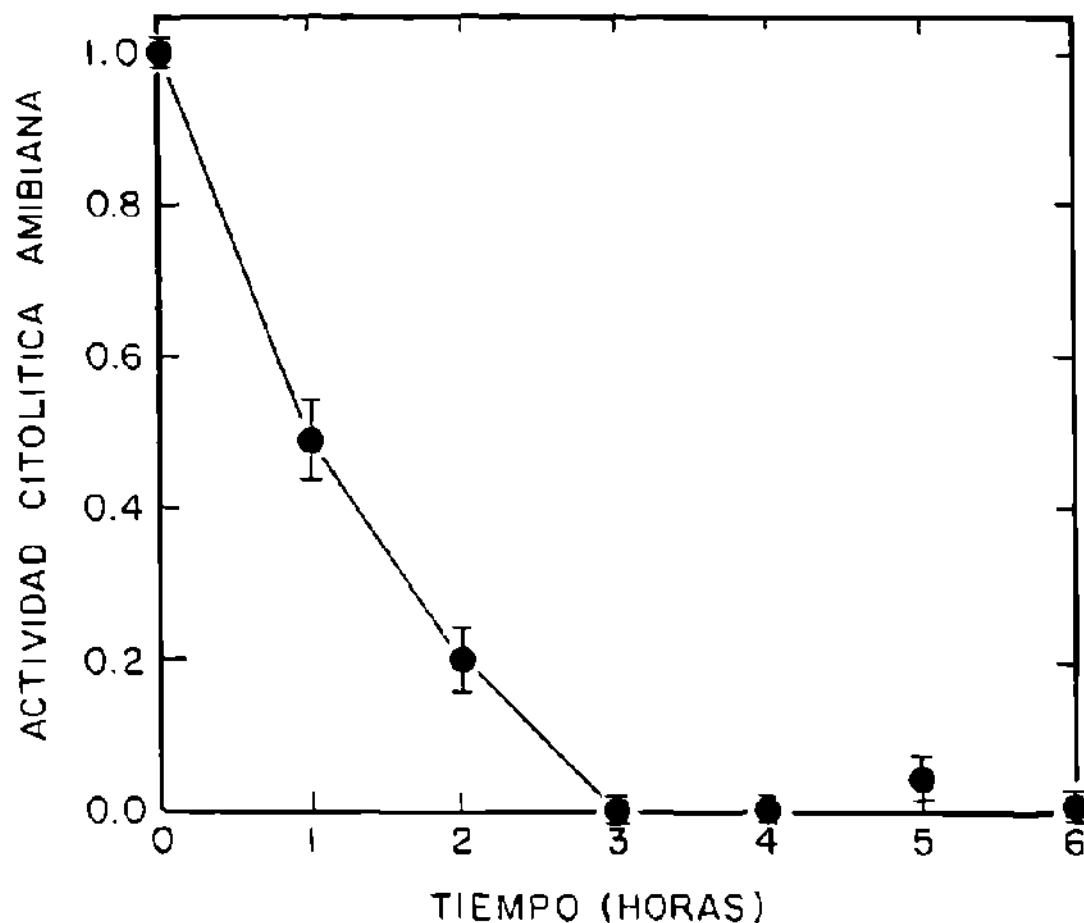
ACTIVIDAD CITOLITICA ESPECIFICA DE LAS FRACCIONES  
SUBCELULARES DE Entamoeba histolytica CEPA HM38.

Fracción	Actividad específica	Actividad relativa.
ET	61.69 UC/mg/30'	0.96
N	34.83 UC/mg/30'	0.54
P30	64.10 UC/mg/30'	1.00
S30	224.22 UC/mg/30'	3.49

Unidad citolítica (UC)=  $\mu$ g de proteínas totales de extracto amibiano para producir el 5% de muerte celular en 30 min de incubación, calculando el porcentaje de muerte por la ecuación que se indica en métodos.



**Fig. 9. Efecto del pH sobre la actividad citolítica dependiente del  $E_h^\circ$ .** Se utilizó una cantidad final fija de la fracción S30 equivalente a 0.5 mg/ml de proteínas totales (50  $\mu$ g por pozo) en presencia de 0.4 mM de DTT para obtener un  $E_h^\circ$  de -150 mV. El pH fue regulado con fosfatos para pH de 5 a 8 y con glicina para pH 9. Cada símbolo representa el promedio y ( $\pm$ ) error estándar de nueve determinaciones.



**Fig. 10. Efecto de la preincubación de la fracción S30 a 36°C.** La fracción S30 se preincubó a 36°C por tiempos variables y posteriormente se probó su actividad citolítica sobre los cultivos celulares. Se utilizaron 50  $\mu$ g de proteínas totales de S30 por pozo, ajustando el  $Eh^\circ$  a -150 mV con 0.4 mM de DTT. Cada símbolo representa el promedio y ( $\pm$ ) error estándar de nueve determinaciones.

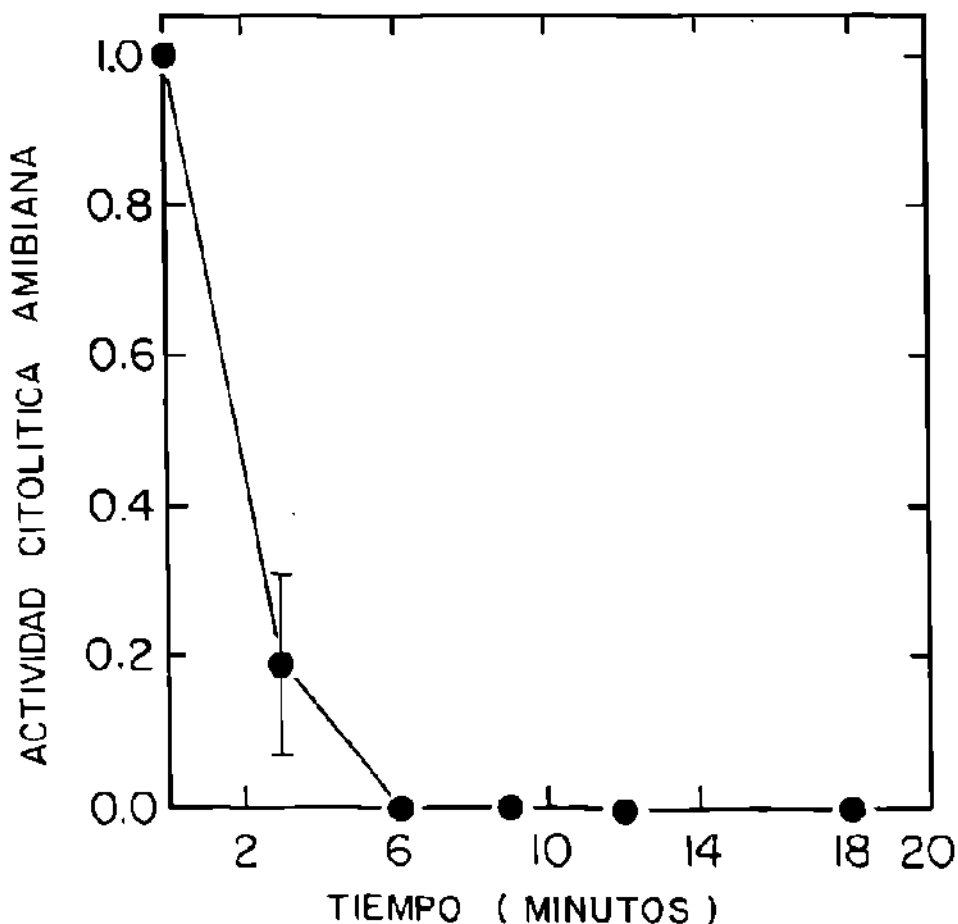
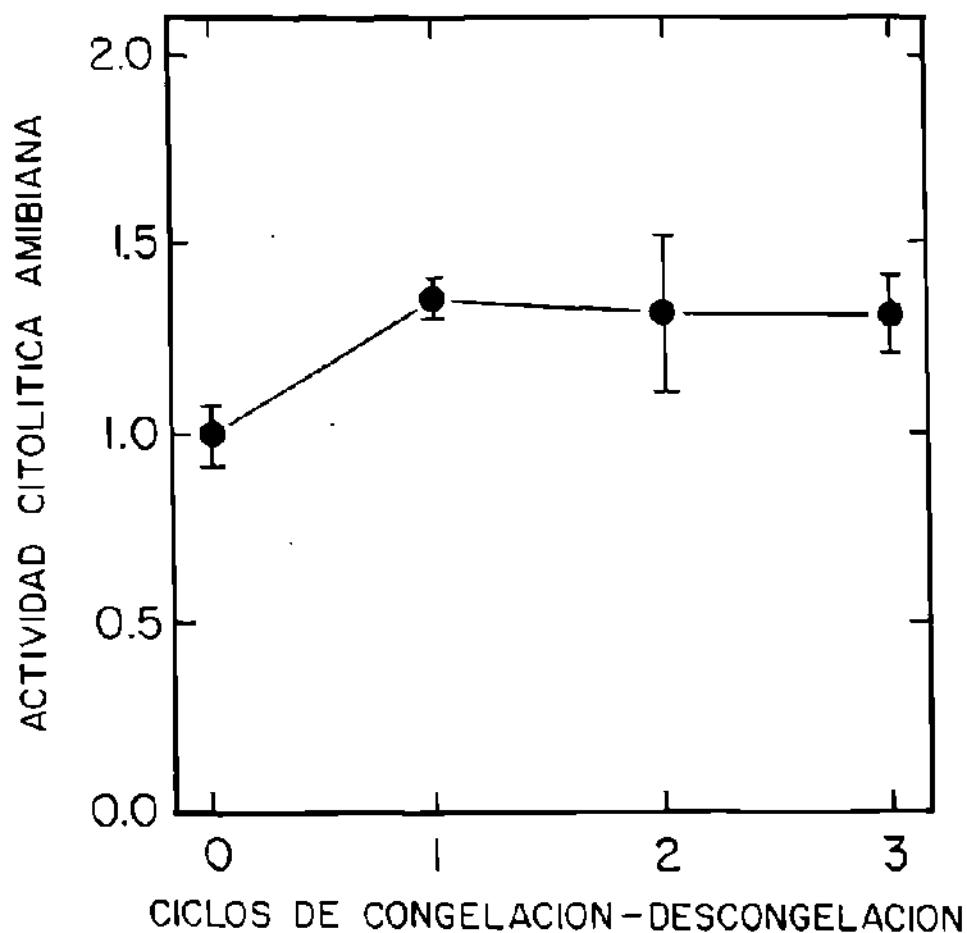


Fig. 11. Efecto de la preincubación de S30 a temperatura de ebullición. La fracción S30 se preincubó a temperatura de ebullición por tiempos variables y luego se analizó su actividad citolítica sobre los cultivos celulares. Las condiciones del experimento son las mismas que para toda la caracterización: 50  $\mu$ g de proteínas totales por pozo y 0.4 mM de DTT. Cada símbolo representa el promedio y ( $\pm$ ) error estándar de nueve determinaciones.



**Fig. 12. Efecto de los ciclos de congelación-descongelación sobre la actividad citolítica.** La fracción S30 recién obtenida se sometió a ciclos repetidos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 36°C. Posteriormente se analizó la potencia de la actividad citolítica dependiente del  $Eh^{\circ}$  sobre los cultivos celulares. Cada símbolo representa el promedio y ( $\pm$ ) error estándar de nueve determinaciones.

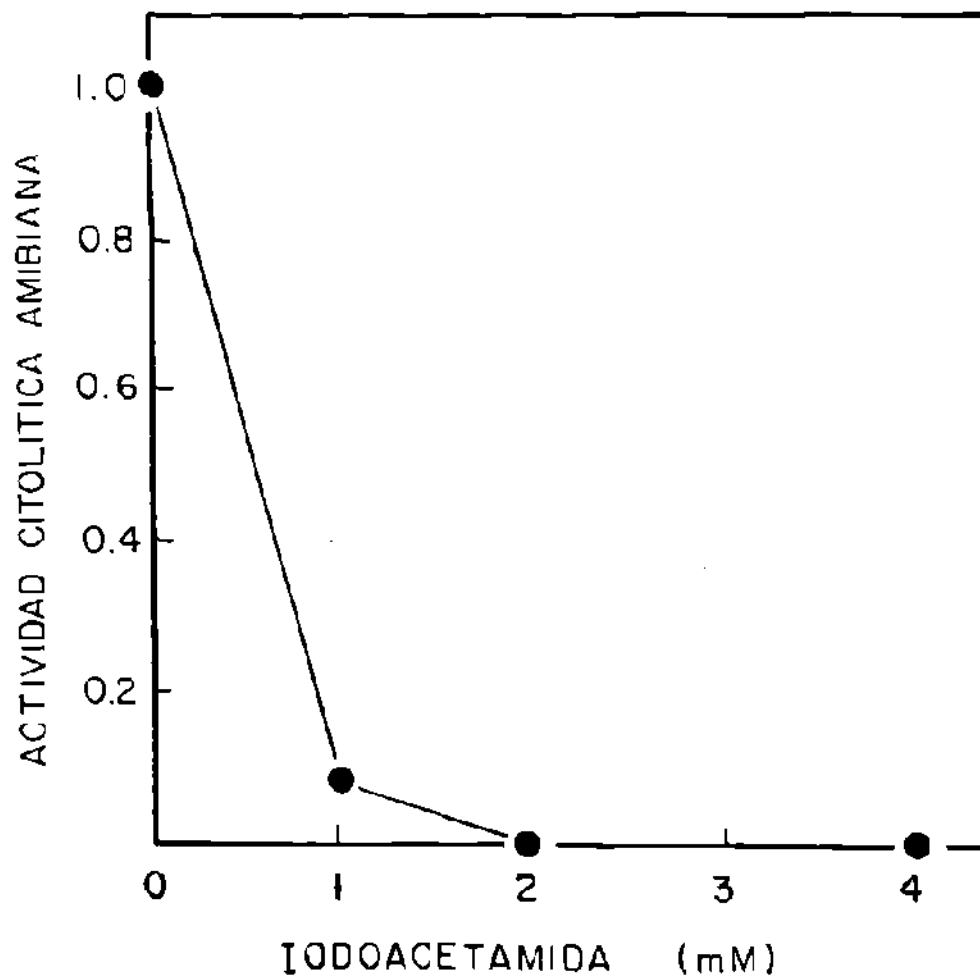


Al incubarse la fracción S30 a temperatura de ebullición, por tiempos variables, la actividad se pierde rápidamente ya que a los 3 minutos se ha perdido el 80% de ella y a los 6 min no se detecta actividad (Fig. 11).

Cuando se sometió la fracción S30 a ciclos de congelación-descongelación, la actividad se incrementa ligeramente después del primer ciclo, para luego mantenerse constante hasta después de 3 ciclos (Fig. 12).

#### **G. Dependencia de grupos -SH**

La actividad citolítica amibiana se anuló cuando fue preincubada con iodoacetamida, un inhibidor irreversible de compuestos con grupos -SH (Fig. 13). La actividad no se restauró, aún cuando se agregó al medio suficiente DTT, para restablecer el potencial que se había encontrado era el óptimo para su efecto (-150 mV).



**Fig. 13. Dependencia de grupos -SH de la actividad citolítica.** La fracción S30 se preincubó en presencia de cantidades variables de iodoacetamida por 30 min a 36°C. Posteriormente se añadió 1 mM de DTT para restaurar un  $E_h^\circ$  de -150 mV y se probó la actividad citolítica sobre células CHO como se ha descrito. Cada símbolo representa el promedio y ( $\pm$ ) error estándar de 12 determinaciones.

## VI. DISCUSION.

Parte fundamental en el proceso por el cual *Entamoeba histolytica* produce las lesiones en los tejidos, es la actividad lítica sobre las células del hospedero. Esta actividad ha sido detectada tanto en trofozoítos vivos (15), como en extractos libres de células (34), utilizando como blanco eritrocitos de diversas especies de mamífero o diferentes líneas celulares en cultivo (32,34). Como factores responsables de esta actividad han sido implicadas principalmente dos moléculas: Una fosfolipasa A<sub>2</sub> dependiente de calcio y la amebaporo, cuyas características ya han sido descritas en la introducción de este trabajo.

La aportación principal de este trabajo es la detección y caracterización de una actividad citolítica presente en extractos de trofozoítos de *E. histolytica*, la cual se debe a una citolisina diferente a las dos descritas hasta ahora.

Inicialmente esta actividad citolítica fue detectada en la fracción amibiana P30 (34), misma fracción subcelular donde se localiza la mayor actividad hemolítica (35), así como también la actividad fosfolipásica (38,46).

Los efectos de la actividad citolítica en la cual se centró el trabajo, son inmediatos y fueron detectados usando como blanco células CHO. Se manifiestan produciendo protusiones en la membrana celular, vacuolización e hinchamiento de las células hasta llegar a la lisis, la cual es detectable desde los primeros segundos de contacto mediante la liberación de ácido α-[<sup>14</sup>C]-amino

isobutírico (37) y claramente visible al microscopio a los 8 min de incubación. Dichas lesiones membranales son muy semejantes a las descritas en epitelio intestinal aislado de cobayos infectados experimentalmente con trofozoítos vivos (70,71). Las lesiones están circunscritas en áreas delimitadas de la membrana plasmática y el efecto es irreversible; las células dañadas se lisan aún después de lavarlas y reincubarlas en medio fresco suplementado con 15% de suero de ternera.

Tomando en cuenta estos datos y que las amibas tienen su hábitat normal en el intestino grueso, sitio en el cual existe un medio ambiente con potencial de óxido-reducción negativo y siendo este el sitio donde generalmente las amibas inician la invasión de los tejidos, consideramos la posibilidad de que *E. histolytica* tuviera una actividad citolítica que trabajara en tales condiciones. Es decir, que su acción dependiera del grado de oxidación presente en el medioambiente.

Para llevar a cabo estos análisis se tenía montado un método para cuantificar a corto tiempo lesiones membranales pequeñas, basado en detectar la salida de un marcador radiactivo ( $[^{14}\text{C}]\text{AIB}$ ). Sin embargo este modelo es difícil de manejar, por lo que se adaptó el método de cuenta total celular y viabilidad por la exclusión del azul de tripano para cuantificar esta actividad. Comparamos los dos métodos y no hubo diferencias significativas entre ellos, por lo que elegimos el segundo método para realizar este trabajo por ser menos complicado más rápido y más económico.

Se aseguró el buen manejo del modelo en el cual se pudieran controlar diferentes  $Eh^\circ$  y cuantificar la actividad citolítica utilizando como testigo a la citolisina lábil al oxígeno mejor caracterizada: la estreptolisina-O. Esta citolisina se pudo manejar adecuadamente ya que solo produjo citólisis en  $Eh^\circ$  negativos tal y como se esperaría de citolisinas de este tipo (Fig. 5). De esta manera se procedió a estudiar la actividad citolítica ambiana en condiciones similares.

Se analizó entonces el efecto que tiene el  $Eh^\circ$  sobre la actividad citolítica, regulando los potenciales con cantidades variables de DTT (para  $Eh^\circ$  negativos) o de peróxido de hidrógeno (para  $Eh^\circ$  positivos). Se encontró que hay dos picos de actividad con respecto al  $Eh^\circ$ . Uno de ellos a +42 mV y el otro a -150 mV (Fig. 6). El primer pico corresponde a la actividad citolítica que se detectó originalmente en ensayos sin regular el  $Eh^\circ$ . El segundo pico es muy importante, pues valida la hipótesis de este trabajo, al detectarse la presencia de una actividad citolítica de *E. histolytica* que actúa en  $Eh^\circ$  negativos, a niveles similares a los que imperan en el intestino grueso.

La actividad que se presenta a +42 mV puede ser debida a un factor diferente al que actúa a  $Eh^\circ$  negativos o a una sola molécula capaz de trabajar a dos  $Eh^\circ$  diferentes. Sin embargo, para saber que es lo que ocurre realmente, será necesario llevar a cabo la purificación del o de los factores responsables y probarlo(s) en ambas condiciones. Por lo pronto este trabajo se

centró en la actividad presente en el  $Eh^\circ$  negativo y fué dicha actividad la que se caracterizó.

La capacidad de causar lisis celular a diferentes  $Eh^\circ$  es una ventajosa adaptación de las amibas, pues podría lesionar tejidos en diferentes ambientes, como en el intestino donde existe un ambiente reducido y ahí iniciar la invasión a tejidos y posteriormente también causar citólisis en el hígado, que es un órgano muy irrigado por sangre y por lo tanto con niveles mayores de oxígeno.

Una de las moléculas responsables de citólisis causada por amibas es la fosfolipasa. Para descartar que la actividad citolítica detectada y cuantificada en  $Eh^\circ$  negativos se debiera a la fosfolipasa se analizó el efecto del  $Eh^\circ$  sobre la actividad fosfolipásica amibiana. Como testigo se utilizó fosfolipasa de veneno de abeja. Los resultados muestran que la fosfolipasa amibiana tiene un intervalo estrecho de actividad con respecto al  $Eh^\circ$  pues tanto para potenciales arriba de +200, así como  $Eh^\circ$  abajo de -200, no se detectó actividad fosfolipásica (Fig. 8). Es importante hacer notar que a -150 mV,  $Eh^\circ$  donde se manifiesta la mayor actividad citolítica, la actividad fosfolipásica es casi nula. La fracción amibiana utilizada para este análisis fue la P30, pues en ella reside la actividad de fosfolipasa, a diferencia de la actividad citolítica dependiente de  $Eh^\circ$  que está principalmente en la fracción S30, descartando con esto a la fosfolipasa como la responsable de la citólisis a  $Eh^\circ$  negativos.

Al analizar las fracciones subcelulares amebianas obtenidas por el método de fraccionamiento utilizado, se encontró que la mayor actividad citolítica específica se encuentra en la fracción S30 (Tabla 1). Lo cual constituyó una ventaja para el modelo usado, ya que la fracción S30 no es particulada como las otras fracciones y esto favorecía la observación al microscopio al no tener partículas que interfirieran con la lectura. Además esto también facilitaría el proceso de una futura purificación de la molécula responsable. Por estos resultados, los análisis siguientes se realizaron utilizando la fracción S30 y alargando el tiempo de incubación de 8 a 30 minutos para hacer más claro el efecto citolítico.

Habiendo encontrado la fracción con mayor actividad y el  $Eh^{\circ}$  óptimo, se procedió a analizar otros parámetros para lograr una mejor caracterización de la actividad.

Las citolisinas lábiles al oxígeno bien caracterizadas como la estreptolisina-O, alveolisina, pneumolisina y otras más trabajan óptimamente a pH neutros, haciéndose los ensayos de estas citolisinas en pH de 6.5 a 8.0 (82-85). En el caso de la actividad citolítica amebiana el pH óptimo fue de 7.0 (Fig. 9), lo cual le da una similaridad más con una toxina de este tipo.

Otros factores que se probaron en este trabajo fueron la preincubación de la fracción amebiana a diferentes temperaturas por tiempos variables para ver su efecto sobre la actividad citolítica.

Cuando la fracción S30 se preincuba a 36°C, la actividad se va perdiendo con el tiempo (Fig. 10). Considerando que S30 es la fracción subcelular amibiana con mayor cantidad de proteasas (35), es muy probable que sean estas las que digieran a la molécula responsable, por lo que se puede pensar que se trata de un péptido.

Una pregunta que surge al conocer la cantidad de proteasas existentes en S30 es que si ellas pudieran ser las responsables de la actividad citolítica, tal como ha sido sugerido por Pérez-Montfort et al. (87,88). En su trabajo, usaron extractos totales amibianos y los inyectaron en ratas, en presencia o ausencia de inhibidores de proteasas, viendo que las lesiones producidas se reducían un 80% en los animales a los que se les administró inhibidores. Sin embargo la concentración usada de inhibidor ( $\alpha$ -2-macroglobulina humana) por el grupo mencionado es muy alta, hasta 50 veces mayor que las recomendadas por las casas proveedoras para inhibir el 100% de la actividad enzimática de proteasas puras; lo que no sucede con las proteasas amibianas, pues a esa concentración no producen inhibición detectable al medir actividad proteolítica sobre azocaseína. Por esta razón es posible que el no desarrollo de las lesiones en rata se deba a un bloqueo inespecífico de otros factores patogénicos, no precisamente proteasas.

En un estudio comparativo de las proteasas presentes en cepas patogénicas y no patogénicas, se encontró que los dos tipos de



cepas tienen un número mínimo semejante de proteasas de similar peso molecular, las cuales aparentemente son vitales para el crecimiento amibiano (89), por lo que no se puede tener la certeza de que las proteasas sean las moléculas más importantes del mecanismo patogénico amibiano.

La actividad citolítica amibiana es termolábil, pues no soporta el tratamiento a temperatura de ebullición, a los 6 min se pierde toda la actividad (Fig. 11). Este es otro dato indicativo de la posible naturaleza peptídica del factor citolítico.

Ciclos de congelación-descongelación no alteran el comportamiento de la actividad, manteniéndose constante cuando se somete hasta 3 ciclos. De acuerdo a la Fig. 12, la actividad aumenta ligeramente luego del primer ciclo, como si hubiera algo que estuviera asociado a ella y que al congelarse y descongelarse la dejara libre, facilitando su acción.

La actividad citolítica descrita aquí es debida a un factor que depende del Eh°. Siendo importante saber a que se debe esa dependencia, se analizó el efecto de la iodoacetamida, el cual es un inhibidor irreversible de compuestos con grupos -SH al producir una reacción de carboximetilación (81).

Las citolisinas lábiles al oxígeno requieren que sus grupos -SH se encuentren reducidos para que la actividad se manifieste (90,91) y al parecer la actividad que se describe aquí es semejante en su comportamiento a estas citolisinas.

Al probar el efecto de la iodoacetamida se podría ver si la

actividad amibiana depende solo del  $Eh^{\circ}$  o específicamente de grupos -SH. La actividad se inhibió con 1 mM de iodoacetamida y no se recuperó, aún agregando suficiente cantidad de DTT (1 mM) para restablecer un potencial de -150 mV, con lo que se puede concluir que la molécula responsable de la actividad depende en su estructura de grupos -SH reducidos para su funcionamiento.

#### CONCLUSIONES.

Mediante un modelo sencillo y confiable ampliamente utilizado, como lo es la determinación del número celular y viabilidad en los cultivos celulares, que fue adaptado para los objetivos del trabajo, se ha podido establecer que *E. histolytica* tiene una actividad citolítica dependiente del potencial de óxido-reducción, y que específicamente depende de grupos -SH. Esta actividad citolítica es la primera de este tipo descrita en amibas, y es debida a un factor diferente a la fosfolipasa y a la amebaporo, las cuales son las dos citolisinas amibianas que han sido caracterizadas y purificadas. En la Tabla 2 se puede ver la comparación de las características de la actividad citolítica descrita en este trabajo con las de la fosfolipasa y las de la amebaporo.

El efecto sobre las células blanco se manifiesta inmediatamente, produciendo protusiones en áreas delimitadas de la membrana plasmática, así como vacuolización e hinchamiento de las células hasta llevarlas a la muerte.

La actividad se encuentra principalmente en la fracción S30. El pH óptimo de la actividad citolítica dependiente del Eh° es 7.0. Es termolábil, pues se inactiva completamente a los 6 min de incubación a temperatura de ebullición. Probablemente se trata de una proteína, pues al incubar la fracción S30 (fracción amibiana con la mayor cantidad de proteasas) a 36°C, la actividad se pierde a las 3 h, indicando una probable digestión por las enzimas presentes en S30. La actividad no es afectada hasta por tres ciclos de congelación-descongelación.

Todas estas características hacen pensar que este factor pudiera ser importante en las primeras fases de invasión amibiana a nivel intestinal.

#### **PERSPECTIVAS.**

Con la caracterización de la actividad citolítica dependiente del Eh°, es posible iniciar la purificación del factor responsable. Al llevar a cabo la purificación será posible analizar específicamente la relación del factor con la virulencia amibiana, realizando análisis desde varios enfoques como sería probar su efecto sobre diferentes células, y sobre animales de experimentación. También teniendo el factor purificado podría analizarse su antigenicidad y de ser antigénico, estudiar si confiere protección en animales infectados con amibas, para ver su importancia en el mecanismo patogénico amibiano.

Otro enfoque sería lograr la secuenciación de la citolisina y

luego la clonación del gen, para después analizar su presencia en cepas amibianas con diferente grado de virulencia y en cepas no patogénicas. También al tener clonado el gen se podría facilitar la obtención de la citolisina por ingeniería genética y hacer los estudios directos sobre su relevancia en la virulencia amibiana.

### ACTIVIDAD CITOLITICA

El efecto ocurre en los primeros segundos.

Permite la salida del [<sup>14</sup>C]AIB.

El daño es localizado, produce protusiones en la membrana celular.

El efecto es irreversible. Las células mueren.

pH óptimo es 7.0

Se manifiesta en Eh° negativo.

Se encuentra principalmente en la fracción S30.

### AMEBAPORO

El efecto ocurre en los primeros segundos.

Abre poros selectivos a cationes.

No se visualizan lesiones en membrana celular.

El efecto es reversible. Las células se recuperan.

pH óptimo es 5.2

No determinado.

Se encuentra en el Sn de 150,000 Xg.

### POSFOLIPASA

Requieren tiempos relativamente largos para actuar como citolisinas. Desintegra la membrana, permite la salida de macromoléculas. La célula se ve ampliamente dañada.

El efecto es irreversible.

pH óptimo es 8.0.

No tiene actividad en Eh° negativo.

Se encuentra principalmente en la fracción P30.

TABLA 2. COMPARACION DE LAS CARACTERISTICAS DE LA ACTIVIDAD CITOLITICA DEPENDIENTE DEL POTENCIAL DE OXIDO-REDUCCION Y LAS CITOLISINAS AMIBIANAS.

## VII. REFERENCIAS.

1. Elsom-Dew, R. 1968 The epidemiology of amoebiasis. *Advances in Parasitology*. 6:1-62.
2. Walsh, J.A. 1986 Problems and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Reviews of Infectious Diseases*. 8:228-238.
3. Kumate, J.; Gutiérrez, G. 1980 *Manual de Infectología*. 7a. edición pp 56-65. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. México.
4. Mirelman, D. 1987 Ameba-bacterium relationship in amebiasis. *Microbiological Reviews* 51:272-284.
5. Sargeant, P.G.; Williams, J.E. 1978 The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 72:519-521.
6. Sargeant, P.G.; Jackson, T.H.F.G.; Simjee, A. 1982 Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates, especially those from liver abscess. *Lancet* i:1386-1388.
7. Mirelman, D.; Bracha, R.; Chayen, A. 1986 *Entamoeba histolytica*: Effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence. *Experimental Parasitology* 62:142-148.
8. Garfinkel, L.I.; Giladi, M.; Huber, M.; Gitler, C.; Mirelman, D.; Revel, M.; Rozenblatt, S. 1989 DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and non pathogenic

- zymodemes. *Infection and Immunity*. 57:926-931
9. Petri Jr., W.A.; Jackson, F.H.G.T.; Gathiram, V.; Kress, K.; Saffer L.D.; Snodgrass, T.L.; Chapman, M.D.; Keren, Z.; Mirelman, D. 1990 Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infection and Immunity* 58:1802-1806.
10. Strachan, W.D.; Chiodini, P.L.; Spice, W.M.; Moody, A.H.; Ackers, S.P. 1988 Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* i:5561-563.
11. Tannich, E.; Horstmann, R.D.; Knobloch, J.; Henning Arnold, H. 1989 Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:5118-5122.
12. Tannich, E.; Burchard, G.D. 1991 Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified *in vitro*. *Journal of Clinical Microbiology* 29:250-255.
13. Griffin, J.L. 1972 Human amebic dysentery. Electron microscopy of *Entamoeba histolytica* contacting, ingesting and digesting inflammatory cells. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 21:895-906.
14. Ravdin, J.I.; Croft, B.Y.; Guerrant, R.L. 1980 Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *Journal*

- of Experimental Medicine. 152:377-390.
15. Ravdin, J.I.; Guerrant, R.L. 1982 A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of Amebiasis. *Review of Infectious Diseases* 4:1185-1207.
  16. Orozco, E.; Guarneros, G.; Martínez-Palomo, A.; Sánchez, T. 1983 *Entamoeba histolytica*: Phagocytosis as a virulence factor. *Journal of Experimental Medicine*. 158:1511-1521.
  17. Mattern, C.F.T.; Keister, A.B.; Casper, P.A. 1978 Experimental amebiasis. III A rapid *in vitro* assay for virulence of *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27:882-887.
  18. McLaughlin, J.; Faubert, G. 1977 Partial purification and some properties of neutral sulfhydryl and acid proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Canadian Journal of Microbiology* 23:420-425.
  19. Muñoz, M.D.I.; Calderón, J.; Rojkind, M. 1982 The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine* 155:42-51.
  20. Gadasi, H.; Kessler, E. 1983 Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity* 39:528-531.
  21. Magauda, P.L.; Pennisi, L. 1969 Lisosomi e protozoi: Rassegna sulle idrolasi acide, dimostrate per via citochimica, nei protozoi e specificatamente in alcune specie di *Entamoeba*. *Revista di Parassitologia* 30:133-146.



22. Gadasí, H.; Kobilér, D. 1983 *Entamoeba histolytica*: Correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Experimental Parasitology* 55:105-110.
23. Scholze, H.; Werries, E. 1984 A weakly protease has a powerful proteolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 11:293-300.
24. Bos, H.J. 1979 *Entamoeba histolytica*: cytopathogenicity of intact amebae and cell-free extracts; isolation and characterization on an intracellular toxin. *Experimental Parasitology* 47:369-377.
25. Lushbaugh, W.B.; Kairalla, A.B.; Cantey, J.R.; Hofbauer, A.F.; Pittman, F.E. 1979 Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from *Entamoeba histolytica*. *Journal of Infectious Diseases* 139:9-17.
26. Ravdin, J.I. 1989 *Entamoeba histolytica*: from adherence to enteropathy. *Journal of Infectious Diseases* 159:420-429.
27. Rodríguez, M.A.; Hernández, F.; Santos, L.; Váldez, A.; Orozco, E 1989 *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Molecular and Biochemical Parasitology* 37:87-100.
28. Rosales-Encina, J.L.; Meza, I.; López-DeLeón, A.; Talamás-Rohana, P.; Rojkind, M. 1987 Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Infectious Diseases* 156:790-797.

29. Blakely, P.; Sargeant, P.G.; Reed, S.L. 1990 An immunogenic 30-kDa surface antigen of pathogenic clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Infectious Diseases* 162:949-954.
30. Ravdin, J.I.; Jackson, T.F.H.G.; Petri, W.A.; Murphy, C.F.; Ungar, B.L.P.; Gathiram, V.; Skilogiannis, J.; Simjee, A.E. 1990. Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Journal of Infectious Diseases* 162:768-772.
31. Torian, B.E.; Reed, S.L.; Flores, B.M.; Creely, C.M.; Coward, J.E.; Vial, K.; Stamm, W.E. 1990 The 96-kilodalton antigen as an integral membrane protein in pathogenic *Entamoeba histolytica*: Potential differences in pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infection and Immunity* 58:753-760.
32. López-Revilla R.; Said-Fernández, S. 1980 Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: hemolytic activity of trophozoite homogenates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29:209-212.
33. Vargas-Villarreal, J.; Said-Fernández, S. 1984 *Entamoeba histolytica*: cytolytic activity of cell-free trophozoite extract upon CHO cells. *Archivos de Investigación Médica* 15:1-12
34. Said-Fernández, S.; Vargas-Villarreal, J.; Castro-Garza, J. 1986 Mecanismo multifactorial de la actividad citolítica de

- Entamoeba histolytica*. Archivos de Investigación Médica 17(Supl. 1):173-178.
35. Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. 1982 Subcellular distribution and stability of the major hemolytic activity of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Zeitschrift für Parasitenkunde. Parasitology Research 67:249-254.
36. Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. 1983 Latency and heterogeneity of *Entamoeba histolytica* hemolysins. Zeitschrift für Parasitenkunde. Parasitology Research 69:435-438.
37. Castro-Garza, J.E. 1986 Detección de una citolisina de efecto inmediato en extractos de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. Desarrollo de un modelo experimental. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.
38. Vargas-Villarreal, J. 1991 Aislamiento y caracterización de una fosfolipasa A<sub>2</sub> de *Entamoeba histolytica* con actividad lítica directa. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.
39. Ravdin, J.I.; Murphy, C.F.; Guerrant, R.L.; Long-Krug, S.A. 1985 Effect of antagonist of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. Journal of Infectious Diseases 152:542-549.
40. Long-Krug, S.A.; Fischer, K.J.; Hysmith, R.M.; Ravdin, J.I. 1985 Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*:

- Description and subcellular localization. *Journal of Infectious Diseases* 152:536-541.
41. Young, J.D.E.; Young, T.M.; Lu, L.P.; Unkeless, J.C.; Cohn, Z.A. 1982 Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine* 156:1677-1690.
42. Lynch, E.C.; Rosenberg, I.M.; Gitler, C. 1982 An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *The EMBO Journal* 1:801-804.
43. Young, J.D.E.; Cohn Z.A. 1985 Molecular mechanisms of cytotoxicity mediated by *Entamoeba histolytica*: characterization of a pore-forming protein (PFP). *Journal of Cellular Biochemistry* 29:299-308.
44. Rosenberg, I.; Bach, D.; Loew, L.M.; Gitler, C. 1989 Isolation, characterization and partial purification of a transferable membrane channel (amoebapore) produced by *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 33:237-248.
45. Leippe, M.; Ebel, S.; Schoenberger, O.L.; Horstmann, R.D.; Müller-Eberhard, H.J. 1991 Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of National Academy of Sciences* 88:7659-7663.
46. Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. 1988 Free fatty acids released from phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of *Entamoeba histolytica* trophozoites.

- Infection and Immunity 56:874-879.
47. Gitler, C.; Mirelman, D. 1986 Factors contributing to the pathogenic behavior of *Entamoeba histolytica*. *Annals Reviews of Microbiology* 40:237-261.
  48. Diamond, L.S. 1968 Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudin, 1903 and *E. histolytica* like amebae. *Journal of Parasitology* 54:1047-1056.
  49. Diamond, L.S.; Harlow, D.R.; Cunnick, C.C. 1978 A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72:431-432.
  50. Wittner, M.; Rosenbaum, R.M. 1970 Role of bacteria in modifying virulence of *Entamoeba histolytica*. *Studies of amebae from axenic cultures. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 19:755-761.
  51. Mattern, C.F.T.; Keister, D.B.; Natovitz, P.C. 1982 Virulence of *Entamoeba histolytica* upon continuous axenic cultivation. *Archivos de Investigación Médica* 13(Supl. 3):185-190.
  52. Chávez, B.; Martínez-Palomo, A.; De la Torre, M. 1978 Estructura ultramicroscópica en la pared de quistes de *Entamoeba invadens*, *E. histolytica* y *E. coli*. *Archivos de Investigación Médica* 9(Supl. 1):113-116.
  53. Mata-Cárdenas, B.D.; Said-Fernández, S. 1986 Wall synthesis in axenic cultures of *Entamoeba histolytica* grown in PEHPS

- medium. *Archivos de Investigación Médica* 17(Supl. 1):25-30.
54. Meerovitch, E.; Ghadirian, E. 1978 Restoration of virulence of axenically-cultivated *Entamoeba histolytica* by cholesterol. *Archivos de Investigación Médica* 9(Supl. 1):253-256.
55. Lushbaugh, W.B.; Kairalla, A.B.; Loadhot, C.B.; Pittman, F.E. 1978 Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27:248-254.
56. Bhol, K.C.; Mukherjee, R.M.; Banerjee, M.; Maitra, T.K.; Jalan, K.N. 1991 Enhancement of virulence of *Entamoeba histolytica* by *in vitro* liver treatment. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 85:341-344.
57. Said-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*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82:249-253.
58. Jacobs, L. 1950 Oxidation-reduction potentials in the cultivation of *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine* 30:803-815.
59. Chang, S.L. 1946 Studies on *Entamoeba histolytica*. IV. The relation of oxidation-reduction potentials to the growth encystation and excystation of *Entamoeba histolytica* in culture. *Parasitology* 37:101-112.

60. Ravdin, J.I. 1986 Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Reviews of Infectious Diseases* 8:247-260.
61. Phillips, B.P.; Wolfe, P.A.; Rees, C.W.; Gordon, H.A.; Wright, W.H.; Reyniers, J.A. 1955 Studies on the ameba-bacteria relationship in amebiasis. Comparative results of intracecal inoculation of germ-free, monocontaminated, and conventional guinea pigs with *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 4:675-692.
62. Phillips, B.P.; Gorstein, F. 1966 Effects of different species of bacteria on the pathology of enteric amebiasis in monocontaminated guinea pigs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 15:863-868.
63. Singh, B.N.; Das, S.R.; Dutta, G.P. 1973 Importance of O-R potential in initiating cultures of axenically grown *Entamoeba histolytica* from small inocula. *Current Science* 42:227-230.
64. Diamond, L.S.; Gillin, F.D. 1980 *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*: Effects of temperature and oxygen tension on growth and survival. *Experimental Parasitology* 49:328-338.
65. Diamond, L.S.; Gillin, F.D. 1981 *Entamoeba histolytica* and *Giardia Lamblia*: Effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. *Experimental Parasitology* 52:9-17.

66. Neal Band, R.; Cirrito, H. 1979 Growth response of axenic *Entamoeba histolytica* to hydrogen, carbon dioxide, and oxygen. *Journal of Protozoology* 26:282-286.
67. Gillin, F.D.; Reiner, D.S.; Levy, R.B.; Henkart, P.A. 1984 Thiol groups on the surface of anaerobic parasitic protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology* 13:1-12.
68. Ghadirian, E.; Somerfield, S.D.; Kongshavn, P.A.L. 1986 Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxidants. *Infection and Immunity* 51:263-267.
69. Gillin, F.D.; Diamond, L.S. 1981 *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: Growth responses to reducing agents. *Experimental Parasitology* 51:382-391.
70. Treviño García-Manzo, N.; Cruz de Lavin, E. 1980 Estudio secuencial de la invasión de la mucosa del colon por *Entamoeba histolytica*. *Archivos de Investigación Médica* 11(Supl. 1):199-209.
71. Mora-Galindo, J.; Martínez-Palomo, A.; Chávez, B. 1978 Interacción entre *Entamoeba histolytica* y el epitelio cecal del cobayo. *Archivos de Investigación Médica* 9(Supl. 1):261-274.
72. McCaul, T.F.; Bird, R.G. 1977 Surface features of *Entamoeba histolytica* and rabbit kidney (RK13) cell surface changes after trophozoite contact-observations by scanning electron microscopy. *International Journal for Parasitology* 7:383-388.



73. Thelestam, M.; Möllby, R. 1979 Classification of microbial, plant and animal cytolysins based on their membrane damaging effects on human fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 557:156-169.
74. Meza, I.; De la Garza, M.; Meraz, A.; Gallegos, B.; De la Torre, M.; Tanimoto, M.; Martínez-Palomo, A. 1986 Isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* isolates from asymptomatic carriers: Use of gradient acrylamide gels. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35:1134-1139.
75. Martínez-Rodríguez, H. 1981 Aislamiento de posibles mutantes "sin sentido" en una línea celular de mamífero. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
76. Puck, T.T.; Ceiciura, S.J.; Robinson, A. 1958 Genetics of somatic mammalian cell. III Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *Journal of Experimental Medicine* 108:945-955.
77. López-Revilla, R.; Rodríguez-Báez, J. 1981 Manual para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. Ciencia y Desarrollo. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México.
78. Lowry, O.H.; Rosbrough, N.S.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 183:265-275.
79. Haberman, E.; Hardt, K.L. 1972 A sensitive and specific test

- for the quantitation of phospholipases. *Annals of Biochemistry* 50:163-173.
80. Konrad Diem 1971 *Tablas Científicas* 6a. edición. Ciba-Geigy S.A. Basilea, Suiza.
81. Lushbaugh, W.B.; Hofbauer, A.F.; Pittman, F.E. 1984 Proteinase activities of *Entamoeba histolytica* cytotoxin. *Gastroenterology* 87:17-27.
82. Bhakdi, S.; Roth, M.; Sziegoleit, A.; Trantum-Jensen, J.; 1984 Isolation and identification of two hemolytic forms of streptolysin-O. *Infection and Immunity* 46:394-400.
83. Geoffroy, C.; Alouf, E. 1982 Interaction of alveolysin a sulfhidryl-activated bacterial cytolytic toxin with thiol group reagents and cholesterol. *Toxicon* 20:239-241.
84. Suzuki, J.; Kobayashi, S.; Kagaya, K.; Fukazawa, Y. 1988 Heterogeneity of hemolytic efficiency and isoelectric point of streptolysin-O. *Infection and Immunity* 56:2474-2478.
85. Johnson, M.K.; Knight, R.J.; Drew, G.K. 1982 The hydrofobic character of thiol-activated cytolytins. *Biochemical Journal* 207:557-560.
86. Saunders, F.K.; Mitchell, T.J.; Walker, J.A.; Andrew, P.W.; Boulnois, G.J. 1989 Pneumolysin, the thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for *in vitro* activity. *Infection and Immunity* 57:2547-2552.
87. Pérez-Montfort, R.; Ostoa-Saloma, P.; Velázquez-Medina, L.; Montfort, I.; Becker, I. 1987 Catalytic classes of

- proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 26:87-98.
88. Pérez-Tamayo, R.; Becker, I.; Montfort, I.; Pérez-Montfort, R. 1989 Papel de los leucocitos y de las proteinasas amibianas en la necrosis testicular experimental producida en la rata por *E. histolytica*. Resúmenes del XI Seminario sobre Amibiasis. México, D.F.
89. De Meester, F.; Shaw, E.; Scholze, H.; Stolarsky, T.; Mirelman, D. 1990 Specific labeling of cysteine proteinases in pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity* 58:1396-1401.
90. Bhakdi, S.; Tranum-Jensen, J.; Sziegoleit, A. 1985 Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infection and Immunity* 47:52-60.
91. Geoffroy, C.; Gilles, A.; Alouf, J.E. 1981 The sulfhydryl groups of the thiol-dependent cytolytic toxin from *Bacillus alvei*. Evidence for one essential sulfhydryl group. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 99:781-788.



