

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POST-GRADO



DETECCION DE UNA CITOLISINA DE EFECTO INMEDIATO EN  
EXTRACTOS DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica.  
DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL.

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA EL

*Biol. Jorge Enrique Castro Garza*

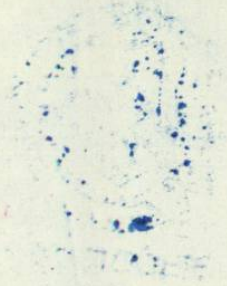
Y, N. L.

SEPTIEMBRE DE 1986

FM  
RC1  
A5  
23  
r. 1



1080071351



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POST-GRADO**



**DETECCION DE UNA CITOLISINA DE EFECTO INMEDIATO EN  
EXTRACTOS DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica.  
DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL.**

**TESIS**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA EL**

*Biol. Jorge Enrique Castro Garza*



**BIBLIOTECA**

**MONTERREY, N. L.**

**SEPTIEMBRE DE 1986**

TM  
R  
A  
3

1 2 6

1

3 2

1

1

1

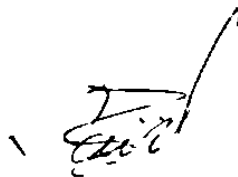
1

BUR  
IR  
DEL  
S

U

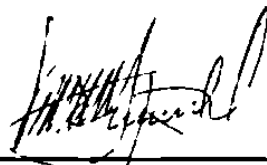
FONDO  
TESIS MAESTRIA

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la División de Biología Celular. Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste. Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la asesoría del Dr. Salvador Said Fernández y del Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla.



---

Dr. Salvador Said Fernández  
Asesor externo de tesis



---

Dr. Manuel A. Rodríguez Q.  
Asesor interno de tesis

DEDICADA A:

JESUCRISTO

MIS PADRES:

ENRIQUE Y

MARIA DEL SOCORRO

MIS HERMANOS:

ROSA MIREYA Y

ERNESTO ALAN

A LA MEMORIA DE MI ABUELO:

JOSE ANGEL GARZA ZAMORA

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Salvador Said Fernández, por su constante apoyo y estímulo para alcanzar ésta meta

Al Dr. Gerardo Forsbach S. y al C.P. Ignacio Atristain A., Director y Administrador de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste del IMSS, por todas las facilidades brindadas para la realización de ésta tesis.

A los Doctores Manuel Rodríguez, José Bustos, Rolando Tijerina y a la MC Irma Rositas por su ayuda y apoyo durante mi tiempo de estudiante en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, así como en la revisión de mi tesis.

A la QFB Letycia Navarro M., al MVZ Gerardo Lozano G., al MC Benito Mata C., al MC Javier Vargas V., a la Biol. Ma. Teresa González Garza y a Victoria Moreno por toda su cooperación en el trabajo de laboratorio y por su amistad.

Al MCP Juan Antonio Luna de la Rosa por el trabajo gráfico que ilustra ésta tesis.

Al MC Ricardo Cerda por su ayuda en cuestiones estadísticas.

A todos mis compañeros y amigos que me han apoyado, especialmente al grupo de los 7.



## INDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	1
I. INTRODUCCION	
Amibiasis.....	2
Hipótesis.....	4
Secuencia del trabajo experimental.....	4
Contribución y perspectivas del presente trabajo.....	5
II. MATERIALES	
A. Origen de los reactivos.....	6
B. Material biológico.....	6
C. Preparación del medio de cultivo McCoy.....	7
Preparación del medio basal McCoy (solución de trabajo <u>1X</u> ).....	7
Solución de antibióticos.....	7
Suero de ternera.....	7
Preparación y almacenamiento del medio completo.....	8
D. Preparación del medio de cultivo PEHPS.....	8
Medio basal PEHP.....	8
Suero de bovino.....	8
Mezcla vitamínica 107.....	8
Medio completo PEHPS.....	9
E. Composición y preparación de las soluciones.....	9
Tripsina al 2.5% .....	9
Tripsina al 0.25% .....	10
Solución de rojo de fenol al 1% .....	10
Amortiguador de pH isotónico de Tris (TD).....	10
Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).....	10
Solución salina balanceada de Hanks (SSB) <u>10X</u> .....	10
SSB <u>1X</u> .....	10
SSB <u>1X</u> con seroalbúmina bovina (SAB).....	11
SSB <u>1X</u> con ácido amino isobutírico (AIB).....	11
Mezcla crónica.....	11
Acido $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ amino isobutírico ( $^{14}\text{C}$ AIB).....	11
$^3\text{H}$ timidina 5 $\mu\text{Ci/ml}$ ( <u>1X</u> ).....	11
III. METODOS	
A. Tratamiento del material para cultivo.....	12
Lavado y esterilización.....	12

Limpieza de la incubadora de CO <sub>2</sub> .....	12
B. Cultivo de células de la línea CHO.....	13
Resiembra y mantenimiento.....	13
Criopreservación de las células.....	13
- C. Cultivos ambientales asepticos.....	13
Resiembra y cosecha.....	13
Cultivos masivos.....	14
D. Obtención de extractos celulares.....	14
Obtención de extractos totales ambientales.....	14
Obtención de extractos totales de hígado de rata.....	14
Obtención de P30.....	15
E. Cuantificación de proteínas.....	15
F. Marcaje de los cultivos de células CHO con [ <sup>14</sup> C] AIB.....	15
G. Determinación de la radiactividad residual en las células y en el producto del lavado de los cultivos.....	17
H. Determinación de la captación de [ <sup>14</sup> C] AIB por células CHO.....	17
I. Determinación de la liberación espontánea de [ <sup>14</sup> C] AIB.....	17
J. Relación entre concentración de Tritón X100 y el porcentaje de liberación de [ <sup>14</sup> C] AIB.....	18
K. Determinación de la distribución de la radiactividad en el sistema.....	18
L. Determinación de la interferencia de la luminiscencia (porcentaje de apagamiento) en las mezclas de ensayo.....	20
M. Preincubación de P30 con AIB no radiactivo.....	20
N. Determinación de la radiactividad liberada de los cultivos celulares por efecto de P30.....	20
O. Determinación de la radiactividad liberada por efecto de P30 a tiempos variables de incubación.....	20
P. Microscopía en contraste de fases de los cultivos celulares tratados con P30.....	22
Q. Marcaje del DNA de los cultivos de células CHO con [ <sup>3</sup> H]timidina..	22
R. Determinación de DNA-[ <sup>3</sup> H] timidina liberada por los cultivos celulares por efecto de P30.....	22

#### IV. RESULTADOS

##### A. ADECUACION DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA CUANTIFICAR ACTIVIDAD CITOLITICA.

###### 1. Eliminación de la radiactividad inespecifica no captada

por las células.....	24
2. Liberación de [ <sup>14</sup> C] AIB por efecto del Tritón X100.....	24
3. Distribución de la radiactividad en el sistema de ensayo en función de la cantidad de P30 agregada.....	26
4. Bloqueo de los posibles sitios de unión para el [ <sup>14</sup> C] AIB en el poliestireno de las microplacas, mediante preincuba- ción de los cultivos celulares con seroalbúmina.....	26
5. Incremento lineal de la interferencia de la luminiscencia (apagamiento) en función de la cantidad de P30. Solución al problema.....	29
B. DETECCIÓN DE UNA ACTIVIDAD CITOLITICA AMBIANA DE EFECTO INMEDIATO.....	29
6. Liberación de [ <sup>14</sup> C] AIB dependiente de la dosis de P30 añadida a cultivos de células CHO.....	29
7. Relación entre la virulencia de <u>E. histolytica</u> y la po- tencia citolítica de los extractos amebianos.....	32
8. Liberación inmediata de [ <sup>14</sup> C] AIB por efecto de P30.....	32
9. Lesiones membranales irreversibles producidas por P30 so- bre células CHO.....	32
10. Liberación de DNA-[ <sup>3</sup> H] timidina a largo plazo por efecto de P30.....	37
V. DISCUSION	
Discusión.....	40
Conclusiones.....	45
Perspectivas.....	45
VII. RESUMEN.....	47
VIII. REFERENCIAS.....	49

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

1. Diagrama de flujo para la obtención de P30.....	16
2. Diagrama de flujo del modelo experimental.....	19
3. Diagrama de los componentes del sistema de ensayo en que se cuantificó la radiactividad.....	21
4. Disminución de la radiactividad basal con respecto al número de lavados de los cultivos de células marcadas.....	25
5. Relación entre el porcentaje de liberación de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB y la cantidad de Tritón X100 añadida a las mezclas de ensayo.....	27
6. Distribución de la radiactividad en función de la cantidad de P30 agregada al sistema de ensayo.....	28
7. Adecuación de la radiactividad en el sistema de ensayo, mediante la preincubación de los cultivos celulares con SAB.....	30
8. Incremento lineal de interferencia de la luminiscencia (apagamiento) en función de la cantidad de P30.....	31
9. Incremento del porcentaje de liberación de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB proporcional a la cantidad de P30 añadida al sistema de ensayo.....	33
10. Relación entre la virulencia de <u>E. histolytica</u> y la potencia citolítica de los extractos amibianos.....	34
11. Liberación inmediata de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB por efecto de P30.....	36
12. Lesiones membranales irreversibles producidas por P30 sobre células CHO.....	38
13. Relación entre el porcentaje de liberación de DNA- [ $^3\text{H}$ ] timidina y la cantidad de P30 en las mezclas de ensayo.....	39
/	
TABLA I Actividad citolítica específica de dos cepas de <u>E. histolytica</u> con diferente virulencia.....	35

## I. INTRODUCCION

La amibiasis es la infección parasitaria ocasionada por Entamoeba histolytica (1) con o sin síntomas clínicos. Se distribuye universalmente afectando aproximadamente al 10% de la población mundial (2). Ocupa el tercer lugar como causante de muerte producida por protozoarios. Se estima que anualmente ocurren 75,000 muertes por amibiasis en el mundo (3). En México constituye un problema muy importante de salud pública por su frecuencia (4) y mortalidad (5).

La infección se produce como resultado de la ingestión de quistes (forma infectiva no móvil), los cuales liberan trofozoítos (amibas o formas móviles) (6), principalmente en el intestino grueso. Desde ahí los trofozoítos pueden invadir cualquier otro órgano. El ciego y el colon ascendente son los sitios más frecuentemente afectados (5).

La enfermedad se caracteriza por la producción de lesiones necróticas, circunscritas a los sitios invadidos por las amibas (7); lo que indica que la virulencia de E. histolytica depende esencialmente de la invasividad, propiedad en la que parece desempeñar un papel relevante la citólisis mediada por contacto (8,9) y la fagocitosis (9).

Se ha propuesto que en el mecanismo de patogenia de la amibiasis participan una serie de productos amibianos con actividades biológicas citopatogénicas. Entre ellas se encuentran enzimas con actividad hidrolítica, tales como proteasas inespecíficas (10), proteasas muy específicas, como la colagenasa (11,12), hialuronidasa (13), fosfatasa ácida y alcalina (14) y fosfolipasa A (15,16,17). Estas enzimas destruyen el cemento intercelular, desprenden las células del estroma, o atacan directamente a las células, como las fosfolipasas.

Prácticamente las únicas dos toxinas no enzimáticas descritas hasta ahora son la enterotoxina (18), que aumenta el peristaltismo y la secreción de agua y sales minerales en asas aisladas de intestino de conejo; y la "amebaporo" (19), una proteína que abre canales permeables a iones en la membrana plasmática.

Para estudiar los efectos citopatogénicos y la destrucción de tejidos producidos por E. histolytica, se han utilizado trofozoítos enteros y extractos amibianos en animales susceptibles (20), tejidos infectados obtenidos en necropsias de humanos (7) o de animales de experimentación (21, 22) y diversas líneas celulares en cultivo (cf. 9).

La relevancia de la fagocitosis en la invasividad amibiana se apoya en que las cepas de mayor virulencia tienen también una mayor capacidad de fagocitosis (23).

La actividad citolítica ha sido detectada en trofozoítos enteros donde primero ocurre adherencia de las amibas a las células blanco, seguida de la lisis de las células adheridas y por último fagocitosis (9). Sin embargo, los esfuerzos de la mayoría de los investigadores han sido infructuosos para detectar actividad citolítica en extractos amibianos. Lo cual es condición indispensable para intentar la purificación de las citolisinas responsables.

En 1980, López-Revilla y Said-Fernández encontraron que los extractos totales de trofozoítos de varias cepas de E. histolytica tienen actividad hemolítica sobre eritrocitos de diversas especies de mamíferos (24). La mayor parte de esta actividad reside en una fracción vesicular llamada P30, la cual es sedimentable a 30,000 Xg (25), es máxima a pH 8.0 en presencia de calcio 1mM y su potencia basal se incrementa hasta cien veces después de 36 h de preincubación a 36°C (26). Poco tiempo después Prasad et al. confirmaron este hallazgo (27).

En 1984, Vargas-Villarreal y Said-Fernández detectaron actividad citolítica de la fracción P30, sobre células en cultivo de la línea CHO. Lo cual no había sido posible hasta entonces. Ello se logró preincubando a 36°C por 30 h la fracción P30. Llamaron a ésta P30 activada. El método utilizado consistió en la cuantificación de la radiactividad liberada de células CHO marcadas con [<sup>3</sup>H] UTP. Esta determinación se efectuó después de incubar las células marcadas con cantidades variables de P30 a 36°C por 4 h. El efecto citolítico es reproducible y depende tanto del tiempo de incubación como de la dosis (28).

Actualmente se han identificado dos toxinas amibianas implicadas en la lisis de las células blanco: a) las fosfolipasas A (15,16,17) y b) la proteína formadora de poros o amebaporo (19,29).

Se ha detectado actividad fosfolipásica en extractos amibianos (15, 16,17). Encontrándose dos tipos de fosfolipasas: Una A<sub>1</sub> y otra A<sub>2</sub>. Además de una lisofosfolipasa(17). Cuando los trofozoítos se incuban en presencia de inhibidores específicos de fosfolipasa, la citólisis mediada por contacto disminuye (16).

La proteína formadora de poros en E. histolytica fué descrita por Young et al. y Lynch et al. (19,30). Esta proteína despolariza la mem-

brana de macrófagos y linfocitos de bazo de ratón, al inducir un flujo selectivo de cationes monovalentes (19). Este efecto ocurre a los 30 seg de incubación, por lo que se ha relacionado con un factor importante en la citólisis mediada por contacto, producida por trofozoítos enteros; la cual ocurre en unos minutos (8). Sin embargo el efecto de la amebaporo es reversible y las células blanco se recuperan después del tratamiento.

Nosotros observamos que la fracción amibiana P30 producía lesiones en células CHO desde los 15 seg de contacto, las cuales después de lavar los cultivos celulares y reincubarlos en medio fresco adicionado con suero se hacían más notables y algunas de las células terminaban por lisarse (31).

Las lesiones producidas a tan corto tiempo no son muy notables y no podían cuantificarse por los métodos que disponíamos. Por lo que iniciamos el desarrollo de un modelo experimental, basado en el descrito por Thellestam y Mollby (32), que nos permitiera cuantificar este efecto. Para ello, utilizamos como marcador el ácido  $\alpha$ -[ $^{14}\text{C}$ ] amino isobutírico ([ $^{14}\text{C}$ ] AIB), el cual ofrece las ventajas de ser: a) un aminoácido no metabolizable, que las células captan eficazmente mediante su sistema de transporte de aminoácidos; y b) su tamaño es adecuado para detectar tanto lesiones extensivas, como aquellas que se manifiestan sólo como un incremento de la permeabilidad a pequeñas moléculas, pero que finalmente resultan en la citólisis. En los primeros intentos no logramos obtener datos cuantitativos de la actividad observada. Por ello decidimos desarrollar y perfeccionar un modelo de cuantificación de citólisis preciso y confiable. Lo cual permitirá después aislar la citolisina responsable.

#### Hipótesis.

Como la capacidad de E. histolytica para destruir tejidos, se debe en gran medida a la citólisis mediada por contacto (33) -la cual ocurre en unos minutos (8)-, y las fracciones subcelulares de trofozoítos de E. histolytica también tienen la propiedad de producir lesiones membranales rápidamente, pensamos que ambos efectos podrían deberse al mismo factor. Una citolisina de efecto inmediato.

#### Secuencia del trabajo experimental.

Dividimos este trabajo en dos partes: La primera consistió en la adecuación de un modelo experimental para cuantificar actividad citolítica. Ello incluyó la solución de los problemas técnicos que ofrecía el trabajar con [ $^{14}\text{C}$ ] AIB como marcador y con una fracción particulada como P30.

La segunda parte consistió en la detección de una actividad de efecto inmediato. Entre los análisis incluimos: a) liberación de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB dependiente de la dosis de P30 añadida a cultivos de células CHO; b) relación entre la virulencia de *E. histolytica* y la potencia citolítica de los extractos amibianos; c) liberación inmediata de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB por efecto de P30; d) registro fotográfico de las lesiones producidas por P30 sobre células CHO y e) liberación a largo plazo de DNA- $^3\text{H}$  timidina por efecto de P30.

#### Contribución y perspectivas del presente trabajo.

El modelo desarrollado permitió detectar una actividad citolítica que actúa en forma inmediata produciendo lesiones irreversibles; al principio manifestadas sólo como un aumento en la permeabilidad de la membrana a pequeñas moléculas, pero que se agravan con el tiempo, hasta lisar a las células. Las características generales de tal efecto nos hace suponer que se debe a una citolisina no descrita hasta ahora. La cual pudiera pertenecer al grupo de toxinas líticas más abundante en la naturaleza: el de las citolisinas lábiles al oxígeno, dependientes de grupos -SH.

El modelo de detección de citólisis inmediata permitirá purificar la molécula responsable para después estudiar su contribución específica en el mecanismo patogénico de la amibiasis.

La existencia de toxinas fuertemente asociadas a membrana plantea problemas adicionales a los conocidos en citolisinas solubles, para lograr detectarlas. Dichos problemas se resolvieron satisfactoriamente en este trabajo. Por ello pensamos que el método aquí descrito podría ser útil para caracterizar actividades citotóxicas similares de otros parásitos.



## II. MATERIALES

### A. Origen de los reactivos.

1. De Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, USA): ácido ascórbico, ácido fólico, ácido p-amino benzoico, azida de sodio, D-biotina, L-cisteína, cloruro de colina, dodecil sulfato de sodio, i-inositol, niacina, niacinamida, pantotenato de calcio, piridoxal-HCl, piridoxina-HCl, reactivo de Folin Ciocalteau, riboflavina, seroalbúmina bovina (fracción V), tiamina, trizma base, Tween 80, vitamina D<sub>2</sub> (calciferol), vitamina E (acetato de alfa tocoferol), vitamina K (menadione-bisulfito de sodio).
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, ácido clorhídrico, dicromato de potasio, ácido sulfúrico, cloruro de calcio, cloruro de sodio.
4. De Bioxón de México: peptona de caseína, glucosa.
5. De Lakeside S.A. (México): penicilina, sulfato de estreptomina.
6. De J.T. Baker de México: bicarbonato de sodio.
7. De Gibco Laboratories (Grand 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 New England Nuclear (Boston, MA., USA): ácido [<sup>14</sup>C] amino isobutírico, [<sup>3</sup>H] timidina.
11. De Sigma de México: Tritón X100.
12. El extracto de hígado y páncreas, el suero de bovino y el suero de ternera fueron producidos en el laboratorio de la División de Biología Celular (UNIBIN-IMSS).

### B. Material biológico.

Cultivos amibianos axénicos de E. histolytica. Proceden del cepario del Dr. López Revilla del Dpto. de Biología Celular, CINVESTAV. La cepa HK9:NIH abreviada en el texto como HK9, fué aislada de un soldado en Corea (34). Ha sido mantenida por cinco años en condiciones axénicas en nuestro laboratorio. Se conocen varias de sus propiedades citopatogénicas (8,24,28). La cepa HM38 es de reciente adquisición por nuestro grupo de trabajo, fué aislada por Margarita de la Torre (comunicación per-

sonal del Dr. López Revilla).

Línea celular de ovario de hamster chino (CHO). Auxótrofa de prolina. Es una población clonal, originada de la clona BC1, que obtuvo la Dra. Martínez-Rodríguez (35) a partir de la cepa OCL61 (American Typa Culture Collection, Maryland, USA). Puck et al aislaron la cepa original en 1958 (36). Es muy sensible a la actividad citolítica de extractos amibianos (28,31) y se ha mantenido viable en nuestro laboratorio por más de cuatro años.

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

Indicamos las concentraciones de las soluciones madre con un número seguido de una X que representa su concentración respecto a la solución de trabajo o solución 1X.

Elaboramos las soluciones con agua desionizada (4.0 M $\Omega$ ) en un desionizador Synbron/Barstead (Barstead Co. Div. of Synbron Corporation, Boston, MA., USA) que almacenamos a temperatura ambiente en botellas de 20 l.

Preparación de medio basal McCoy (solución de trabajo 1X).

Disolvimos 12 g de medio en polvo McCoy 5A modificado en 800 ml de agua desionizada, añadimos 2.2 g de NaHCO<sub>3</sub> y 10 ml de la solución de antibióticos 100X. Ajustamos el pH a 7.0 y aforamos a 1000 ml. Esterilizamos por filtración a través de membranas de nitrocelulosa HAWP (poros de 0.22  $\mu$ m (Millipore Corporation, Bedford, MA., USA), distribuyendo el medio en volúmenes de 100 ml en botellas estériles de borosilicato con tapón de rosca, incubamos el medio una semana a 36°C para prueba de esterilidad y lo almacenamos a 4°C.

Solución de antibióticos (100X).

Penicilina G-sódica 200,000 U.I. y sulfato de estreptomina 0.5 g. Disolvimos los componentes en 100 ml de agua desionizada. Esterilizamos la solución por filtración y la almacenamos a -20°C en alícuotas de 10 ml en tubos estériles con tapón de rosca (16 X 100 mm, Pyrex).

Suero de ternera.

El suero almacenado a -20°C lo descongelamos en baño maría a 36°C, después lo descomplementamos a 56°C por 30 min, agitándolo suavemente cada 5 min. Lo transferimos a botellas recién esterilizadas, en volúmenes de 40 ml. Incubamos el suero a 36°C por una semana para comprobar su esterilidad y lo almacenamos a -20°C.

### Preparación y almacenamiento del medio completo.

Añadimos asépticamente 15 ml de suero de ternera a botellas con 100 ml de medio basal (solución de trabajo 1X) quedando completo el medio McCoy; lo usamos inmediatamente o lo almacenamos a 4°C.

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

#### Medio basal PEHP.

Fue desarrollado por nosotros. Extracto de hígado y páncreas (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.

Mezclamos y disolvimos los componentes en los 125 ml del EHP y agregamos 300 ml de agua desionizada. Ajustamos el pH a 7.0 con NaOH 10N. Aforamos a 500 ml con agua desionizada y distribuimos el medio en alícuotas de 10 ml en tubos para cultivo de 16 X 125 mm, con tapón de rosca (Pyrex o Kimax, Mty, N.L., México), o de 350 ml en frascos para cultivo en suspensión de 500 ml ('spinners', Bellco Glass Inc. Vineland, N.J., USA). Esterilizamos el medio en autoclave por 15 min a 15 lb de presión con los tapones flojos, los que apretamos después, estando los recipientes todavía calientes. Almacenamos el medio a temperatura ambiente.

#### Suero de bovino.

El suero almacenado a -20°C lo descongelamos en baño maría a 36°C y lo descomplementamos a 56°C por 30 min, agitándolo suavemente cada 5 min. Transferimos asépticamente 40 ml de suero a botellas estériles de borosilicato con tapón de rosca y los incubamos a 36°C por una semana para comprobar su esterilidad y lo almacenamos a -20°C.

#### Mezcla vitamínica 107.

Esta mezcla se compone de cinco soluciones primarias y su composición corresponde a la descrita por Diamond (34).

##### 1. Vitaminas B solubles en agua.

Solución a. Disolvimos 62.5 mg de niacina y 125 mg de ácido p-amino benzóico en agua desionizada hirviendo y aforamos a un volumen total de 150 ml.

Solución b. Niacinamida 62.5 mg; piridoxina-HCl 62.5 mg; piridoxal-HCl 62.5 mg; i-inositol 125 mg; colina-HCl 1,250 mg. Disolvimos los componentes en agua desionizada aforando a 150 ml.

Solución c. Disolvimos 25 mg de riboflavina en 75 ml de agua desioni-

zada añadiendo NaOH 0.1N gota por gota. Aforamos a 100 ml con agua desionizada.

## 2. Solución de biotina.

Disolvimos 30 mg de D-biotina en 200 ml de agua desionizada añadiendo NaOH 0.1N y aforamos a 300 ml con agua desionizada.

## 3. Solución de ácido fólico.

Disolvimos 30 mg de ácido fólico en 200 ml de agua desionizada añadiendo NaOH 0.1N y aforamos a 300 ml con agua desionizada.

## 4. Vitaminas A, D y K solubles en lípidos.

Solución a. Disolvimos 300 mg de vitamina D<sub>2</sub> (calciferol) en 63 ml de alcohol etílico al 95% (V/V). A ésta solución le añadimos 300 mg de vitamina A.

Solución b. En 300 ml de una solución acuosa de Tween 80 al 5% (V/V) disolvimos 60 mg de vitamina K (menadione-bisulfito de sodio).

La solución b la combinamos con la solución a y aforamos a 3000 ml con agua desionizada.

## Preparación de la mezcla de trabajo de vitaminas.

Mezclamos las cinco soluciones en la siguiente proporción: 500 ml de la solución 1; 250 ml de la solución 2; 250 ml de la solución 3; 2,500 ml de la solución 4 y 250 ml de la solución 5. Esterilizamos por filtración y almacenamos en alícuotas de 10 ml en tubos de borosilicato con tapón de rosca a -20°C. Si después de congelar y descongelar a temperatura ambiente aparecía turbio, lo descartábamos. La turbidez nos indica que usamos NaOH en exceso al preparar las soluciones.

## Medio completo PEHPS.

Añadimos asépticamente a los tubos con 10 ml de medio basal PEHP, 1 ml de suero bovino descomplementado adicionado con 25% de la mezcla vitamínica 107.

## E. Composición y preparación de las soluciones.

### Tripsina al 2.5%.

Disolvimos 2.5 g de tripsina 1:250 Difco en 100 ml de agua desionizada estéril y la agitamos suavemente toda la noche a 4°C con un agitador magnético. Filtramos la solución por papel Whatman No. 1 con un embudo Buchner, la esterilizamos por filtración y la almacenamos a -20°C, en alícuotas de 10 ml.

Tripsina al 0.25%.

Mezclamos 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 esterilizamos la solución por filtración y la almacenamos a  $-20^{\circ}\text{C}$  en porciones de 5 ml. Incubamos un tubo de cada lote, elegido al azar, por tres días a  $36^{\circ}\text{C}$  para cerciorarnos de su esterilidad.

Solución de rojo de fenol al 1%.

Disolvimos 1.0 g del colorante en 6 ml de NaOH 1N y aforamos a 100 ml con agua desionizada. Filtramos la solución en papel Whatman No. 1 y la almacenamos a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un frasco de borosilicato con tapón de rosca.

Amortiguador de pH isotónico de Tris (TD).

NaCl 8 g; KCl 3.75 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 g; trizma base 3 g.

Disolvimos los componentes en 90 ml de agua desionizada, añadimos 30 ml de HCl 1N, aforamos su volumen a 1,000 ml con agua desionizada, la esterilizamos en autoclave y la almacenamos a temperatura ambiente distribuida en alícuotas de 100 ml, en botellas de borosilicato con tapón de rosca.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

NaCl 6.5 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.8 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g.

Disolvimos los componentes en 100 ml de agua desionizada estéril, ajustamos el pH a 7.4-7.5 con NaOH 10N, esterilizamos la solución en autoclave y la almacenamos a temperatura ambiente, en alícuotas de 100 ml.

Solución salina balanceada de Hanks (SSB) 10X.

CaCl 0.7 g; glucosa 1.0 g; NaCl 7.2 g; KCl 0.4 g;  $\text{MgSO}_4$  0.2 g; trizma base 0.12 g.

Mezclamos y disolvimos todos los componentes en agua desionizada. Ajustamos el pH a 7.0 con NaOH 10N. Aforamos la solución a 100 ml y la distribuimos en volúmenes de 10 ml en tubos de borosilicato con tapón de rosca, esterilizando por filtración y la almacenamos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

SSB 1X.

Preparamos la solución de trabajo diluyendo 10 ml de la solución 10X con 90 ml de agua desionizada estéril. Nos cercioramos de que la osmolaridad final fuera de 290 mOsm/Kg, la esterilizamos por filtración y la usamos inmediatamente o la almacenamos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

SSB 1X con seroalbúmina bovina (SAB).

Agregamos 10 mg/ml de SAB a la solución 1X de SSB, ajustamos el pH a 7.0 y esterilizamos por filtración. Lo almacenamos a  $-20^{\circ}\text{C}$  en botellas de borosilicato con tapón de rosca con capacidad para 40 ml.

SSB 1X con ácido  $\alpha$  amino isobutírico (AIB).

Agregamos 2 mg/ml o 4 mg/ml de AIB a la solución 1X de SSB, ajustamos el pH a 7.0 y esterilizamos por filtración. Lo distribuimos en alícuotas de 10 ml y lo almacenamos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Mezcla crómica.

Disolvimos 100 g de dicromato de potasio en 750 ml de agua desionizada. Depositamos la solución en un recipiente extendido de polipropileno o de vidrio, colocado sobre abundante hielo picado y después le añadimos lentamente a la mezcla 250 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, agitando constantemente. La mezcla crómica la almacenamos a temperatura ambiente en un recipiente de polipropileno (Nalgene).

Acido  $\alpha$ [ $^{14}\text{C}$ ] AIB amino isobutírico ([ $^{14}\text{C}$ ] 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 6.37 ml de SSB 1X, depositamos en condiciones asépticas 65  $\mu\text{l}$  de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB (53.2 mCi/mmol) con 65  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.01N y almacenamos la solución a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

[ $^{14}\text{C}$ ] AIB 0.5  $\mu\text{Ci/ml}$  (1X).

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

[ $^3\text{H}$ ] timidina 5  $\mu\text{Ci/ml}$  (1X).

En un tubo de polipropileno estéril para cultivo, conteniendo 10 ml de medio de cultivo McCoy completo, añadimos 50  $\mu\text{l}$  de [ $^3\text{H}$ ] timidina (2.0 Ci/mmol). Lo utilizamos inmediatamente o lo almacenamos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### III. METODOS

#### A. Tratamiento del material para cultivo.

El tratamiento del material y los métodos de cultivo, resiembra y cosecha en tubos de 16 X 125 mm fueron los descritos por López-Revilla y Rodríguez-Baez (37).

El medio FEHPS y las técnicas de cultivos ambianos en suspensión se desarrollaron en el laboratorio de la División de Biología Celular, UNIBIN-IMSS.

El lavado de tubos, botellas y frascos para cultivos en suspensión comprendió los siguientes pasos: 1) enjuague por lo menos doce horas en hipoclorito de sodio diluido al 1% en agua de la llave; 2) tallado con escobillón; 3) cuatro enjuagues con agua de la llave; 4) enjuague por 12 h con ácido clorhídrico al 1%; 5) siete enjuagues con agua de la llave; 6) tres enjuagues con agua destilada y 7) secado a temperatura ambiente con el material colocado boca abajo en canastillas metálicas y homeadas a 200°C por 3 h.

Las pipetas serológicas (Bellico Glass Inc. N.J., USA) y las pipetas Pasteur se lavaron mediante: 1) remojo en Microquat al 1% en pipeteros de polipropileno Nalgene (Nalgene Labware Division, N.Y., USA) por 12 h; 2) enjuague en un sifón (Nalgene) para lavar pipetas por lo menos 2 h; 3) remojo en mezcla crónica por 12 h; 4) enjuague en un sifón por 30 min y 5) dos enjuagues por inmersión en pipeteros con agua destilada. Las pipetas se esterilizaron envueltas en papel en autoclave por 15 min a 15 lb de presión y secadas en un horno a 100°C.

Los tapones de los recipientes de cultivo se remojaron en Microquat al 1% por 12 h y después se terminaron de lavar como los tubos y botellas, dejándolos escurrir para secarlos.

Los bulbos para pipetas serológicas cortas y para pipetas Pasteur se esterilizaron en autoclave, guardándolos en frascos de boca ancha y tapón de rosca. Los bulbos contaminados con material biológico se esterilizaron en autoclave y después se lavaron como los tapones.

Limpieza de la incubadora de CO<sub>2</sub>. Limpiamos el interior de la incubadora (National Heinicke, OR., USA) por lo menos una vez al mes, primero con SDS al 1% y después con etanol comercial al 96%. Lavamos las charolas por separado con SDS al 1% y las esterilizamos en el horno a 200°C por 3 h.

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

### Resiembra y mantenimiento.

Retiramos asépticamente por succión el medio de cultivo de las botellas de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon, CA., USA) donde estaban creciendo las células, añadimos 1 ml de tripsina 0.25% e incubamos los cultivos por 10 min a 36°C. Después transferimos la suspensión de células a tubos cónicos, graduados, con tapón de rosca. Lavamos los cultivos dos veces con SSB centrifugando a 600 Xg por 5 min (en una centrifuga DPR, 6000, cabezal 289, Damon IEC Div., N.Y., USA). Resuspendimos la pastilla con 5 ml de medio fresco y contamos las células en un hematómetro (American Optical, Scientific Instruments Div., N.Y., USA). Sembramos 1 X 10<sup>3</sup> células por ml en botellas nuevas a las cuales añadimos 5 ml de medio McCoy completo y las incubamos a 36°C, en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%.

Mantuvimos la cepa de referencia resembrando las células cada siete días a dos cajas. Conservamos los cultivos de la resiembra anterior hasta comprobar el crecimiento y la ausencia de contaminación en los cultivos recientes.

### Criopreservación de las células.

Cosechamos las células en tubos cónicos graduados como se describe anteriormente. Resuspendimos la pastilla en un volumen de medio McCoy completo con 10% de dimetilsulfóxido y ajustamos la suspensión a una concentración de 1-2 X 10<sup>6</sup> células por ml y las colocamos en tubos estériles de polipropileno de 2 ml de capacidad (A/S Nunc, CA., USA) y las congelamos sucesivamente a -20°C por 2-3 h, a -70°C por 2-3 h y a -196°C en nitrógeno líquido.

Para la descongelación tomamos un tubo con células congeladas y lo pasamos directamente a 36°C en baño maría para descongelado rápido. Colocamos el contenido en dos botellas de 25 cm<sup>2</sup> y le agregamos 5 ml de medio McCoy completo. A las cuatro horas cambiamos el medio para eliminar el dimetilsulfóxido.

## C. Cultivos ambianos axénicos.

### Resiembra y cosecha.

Incubamos las cepas HK9 y HM38 de E. histolytica a 36°C (en una incubadora National Heinicke Co. OR., USA). Antes de cada resiembra observamos los cultivos en un microscopio invertido (Biovert, Reichert, Austria) para comprobar el buen aspecto morfológico y la movilidad de las amibas. Colo-



camos el mejor cultivo de cada cepa en agua-hielo por 10 min, determinamos la concentración amibiana en un hematímetro e inoculamos  $1 \times 10^3$  trofozoítos por ml a cada uno de otros tres tubos con medio PEHPS fresco. Conservamos los cultivos de la penúltima resiembra hasta comprobar el crecimiento de las amibas y la ausencia de contaminación en los cultivos recién sembrados. Resembramos los cultivos cada 5 días correspondiendo a la última parte de la fase log de crecimiento. Cosechamos las amibas mediante enfriamiento de los cultivos en agua-hielo por 10 min, los centrifugamos a 600 Xg (en una centrifuga IEC-B-20-A Centrifuge Damon/IEC Div. rotor 2/76) por 10 min a 4°C y los lavamos con SSB.

Cultivos masivos.

Obtuvimos los cultivos masivos de E. histolytica utilizando frascos para cultivo en suspensión ("spinners") de 500 ml de capacidad. Inoculamos  $3 \times 10^3$  amibas por ml de medio PEHP y 35 ml de suero bovino descomplementado, adicionado con la mezcla vitamínica 107 (medio PEHPS: 385 ml). Los incubamos 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 durante 3-4 días.

Terminado el tiempo de incubación, procedimos a cosechar los trofozoítos mediante inmersión del frasco en agua-hielo por 10-15 min. Centrifugamos 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 las lavamos con dos volúmenes de SSB.

#### D. Obtención de extractos celulares.

Obtención de extractos totales amibianos.

Partimos de una suspensión de trofozoítos lavados compuesta por un volumen de amibas y dos volúmenes de SSB. Los resuspendimos, agitándolos suavemente con una pipeta Pasteur y los homogenizamos con 100 golpes de un homogenizador tipo Elvehjem-Potter, de borosilicato, con émbolo de teflón (Bellco Glass, Inc. N.J., USA), activado con un motor eléctrico a 1,000 rpm. Después de este tratamiento no observamos trofozoítos enteros.

Obtención de extractos totales de hígado de rata.

En condiciones asépticas obtuvimos el hígado de una rata macho, adulta, lo lavamos dos veces con SSB y los cortamos en pequeños trozos con un bisturí, lo homogenizamos con dos volúmenes de SSB como lo hicimos con las

amibas.

#### Obtención de P30.

Centrifugamos los extractos totales amibianos o de hígado de rata a 135 Xg por 15 min y obtuvimos un sedimento, la fracción nuclear (N) y el sobrenadante correspondiente, que centrifugamos a 30,000 Xg por 15 min. El sedimento correspondió a la fracción P30, la cual resuspendimos con dos volúmenes de SSB. Durante este proceso manipulamos todas las muestras a 4°C, según el esquema de la Fig. 1.

#### E. Cuantificación de proteínas.

Determinamos la concentración de proteínas biológicas mediante el método de Lowry et al (38). En tubos de ensayo colocamos muestras por triplicado de 0.2 ml que contenían entre 5 y 80 µg de proteínas; agregamos 1 ml del reactivo C ( 1 ml de tartato de sodio al 1% y CuSO<sub>4</sub> al 0.5%, diluido en 50 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% y NaOH 0.1N), agitamos las muestras en un vórtex y las incubamos 10 min a temperatura ambiente; después añadimos 0.1 ml de reactivo de Folin Ciocalteau 1N, titulado con un volumen de HCl 1N, agitamos la solución inmediatamente después con un vórtex, incubamos las muestras 30 min a temperatura ambiente y determinamos la densidad óptica de cada una de ellas a 750 nm en un espectrofotómetro (Zeiss, modelo PMQ III, Alemania). Calculamos la masa de proteínas de las muestras amibianas con la ecuación que determinamos al analizar, por regresión lineal, la relación DO<sub>750</sub> con respecto a cantidades variables de seroalbúmina bovina. Obtuvimos esta ecuación para cada una de las determinaciones realizadas.

#### F. Marcaje de los cultivos de células CHO con [<sup>14</sup>C] AIB.

En placas para microensayo (Microtest, Falcon, TEX., USA), con 96 pozos de fondo plano, sembramos  $1.5 \times 10^4$  células por pozo ( 50% de confluencia) en 200 µl de medio McCoy completo. Cubrimos las placas con películas transparentes (Film, Pressure Sensitive, Microtest, Falcon, TEX., USA) y las incubamos por 20-24 h a 36°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, para que se formaran las monocapas confluentes. Enseguida aspiramos el medio con una pipeta Pasteur, lavamos tres veces los cultivos con 100 µl de SSB a 36°C y añadimos a cada pozo 100 µl de SSB o SSB adicionado con SAB (10 mg/ml). Reincubamos los cultivos por 1 h, para después aspirar el medio, lavar los cultivos tres veces con SSB y añadir a cada pozo 25 µl de SSB,

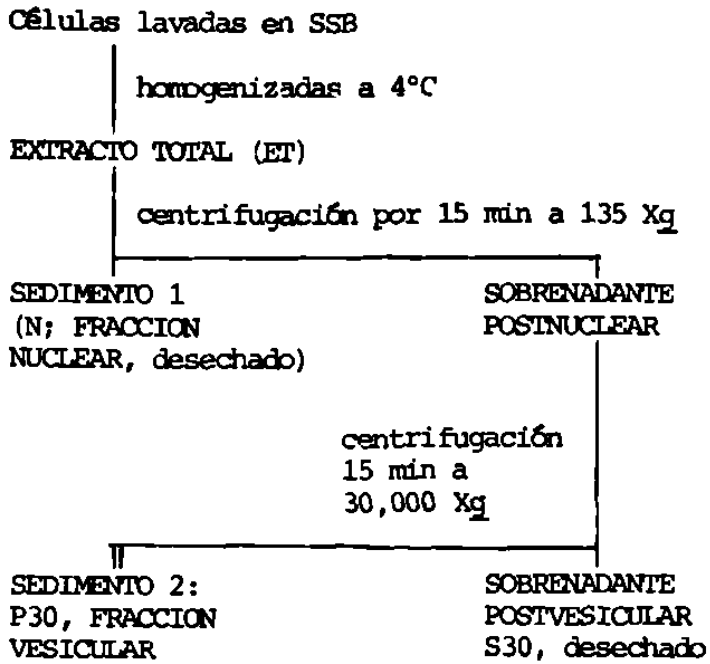


Fig. 1. Diagrama de flujo para la obtención de P30.

adicionado con 0.5  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $[^{14}\text{C}]$  AIB y reincubamos por 4 h para que las células captasen el marcador radiactivo. Enseguida lavamos los cultivos con SSB.

#### G. Determinación de la radiactividad residual en las células y en el producto del lavado de los cultivos.

Cuantificamos la radiactividad recuperada de los cultivos celulares, incubados por 4 h con el marcador radiactivo, en el producto de los volúmenes del primero al quinto lavado con 100  $\mu\text{l}$  de SSB. Transferimos los volúmenes de lavado a tubos de borosilicato de 3 ml de capacidad, cónicos, con tapón de vidrio esmerilado (Pyrex). Añadimos a cada muestra 25  $\mu\text{l}$  de NaOH 10N agitando el contenido de cada tubo con un vórtex, después agregamos 25  $\mu\text{l}$  de HCl concentrado agitando nuevamente. Enseguida colocamos 25  $\mu\text{l}$  de muestra sobre papeles filtro de 1.5 cm por lado, los secamos a 80°C por 1 h colocándolos en viales para centelleo líquido, agregamos 5 ml de líquido para centelleo y cuantificamos la radiactividad en un espectofotómetro de centelleo líquido (Tri-Carb, Packard, modelo 3000 USA) ajustado al 95% de eficiencia para  $[^{14}\text{C}]$ .

Después de los lavados correspondientes lisamos las células con Tritón X100 al 0.5% y transferimos las mezclas a tubos cónicos, más el producto de dos lavados con 50  $\mu\text{l}$  de SSB de los pozos donde estaban los cultivos y procedimos de igual manera que con los volúmenes producto de los lavados.

#### H. Determinación de la captación de $[^{14}\text{C}]$ AIB por células CHO.

Después de marcar las células en la forma antes descrita y lavarlas cinco veces con SSB, lisamos las células con 25  $\mu\text{l}$  de Tritón X100 al 0.5%; transferimos las mezclas y el producto de dos lavados con 50  $\mu\text{l}$  de SSB a tubos cónicos y procedimos para su cuantificación como describimos para determinar la radiactividad en los lavados después del marcaje. Esta determinación es equivalente a nuestro control de liberación máxima (IM).

#### I. Determinación de la liberación espontánea de $[^{14}\text{C}]$ AIB.

En cultivos premarcados determinamos la liberación espontánea de  $[^{14}\text{C}]$  AIB a los 8 min de incubación o tiempos variables entre 0 y 8 min de incubación con SSB o SSB adicionado con AIB no radiactivo (2mg/ml). Terminado el tiempo de incubación recogimos la suspensión extracelular (SE) de los cultivos transfiriéndola a tubos cónicos, más el producto de dos lava-

dos con 50  $\mu$ l de SSB y procedimos de la misma manera antes descrita para su cuantificación. Esta determinación es equivalente a nuestro control de liberación espontánea (LE).

J. Relación entre concentración de Tritón X100 y el porcentaje de liberación de [ $^{14}$ C] AIB.

Teniendo las condiciones de marcaje de los cultivos y de experimentación procedimos a probar nuestro modelo con el agente tensoactivo Tritón X100.

Incubamos los cultivos marcados con [ $^{14}$ C] AIB por 8 min con concentraciones de Tritón X100 entre 0.00125% y 0.1%, después de lo cual transferimos la SE y el producto de dos lavados con SSB a tubos cónicos para determinar la radiactividad en la forma ya descrita.

Calculamos el porcentaje de liberación del marcador mediante la ecuación de Thelestam y Mollby:

$$\%C = \frac{L_{Ex} - LE}{LM - LE} \times 100$$

donde %C significa el porcentaje de citólisis;  $L_{Ex}$  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 a la liberación máxima, equivalente a la captación total del marcador, determinada después de lisar los cultivos celulares con Tritón X100 al 0.5%.

Como en nuestro modelo el porcentaje de liberación del marcador es menor que la proporción de células lisadas al final de la postincubación, cambiamos el término %C por %LES que significa porcentaje de liberación específica, el cual sigue siendo una cantidad porcentual calculada a partir de la liberación experimental, teniendo por límites los testigos positivo y negativo del sistema. La ecuación final es entonces la siguiente:

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

En la Fig. 2 esquematizamos el diagrama de flujo del modelo experimental.

K. Determinación de la distribución de la radiactividad en el sistema.

Después de incubar por 8 min los cultivos celulares con 25  $\mu$ l de can-

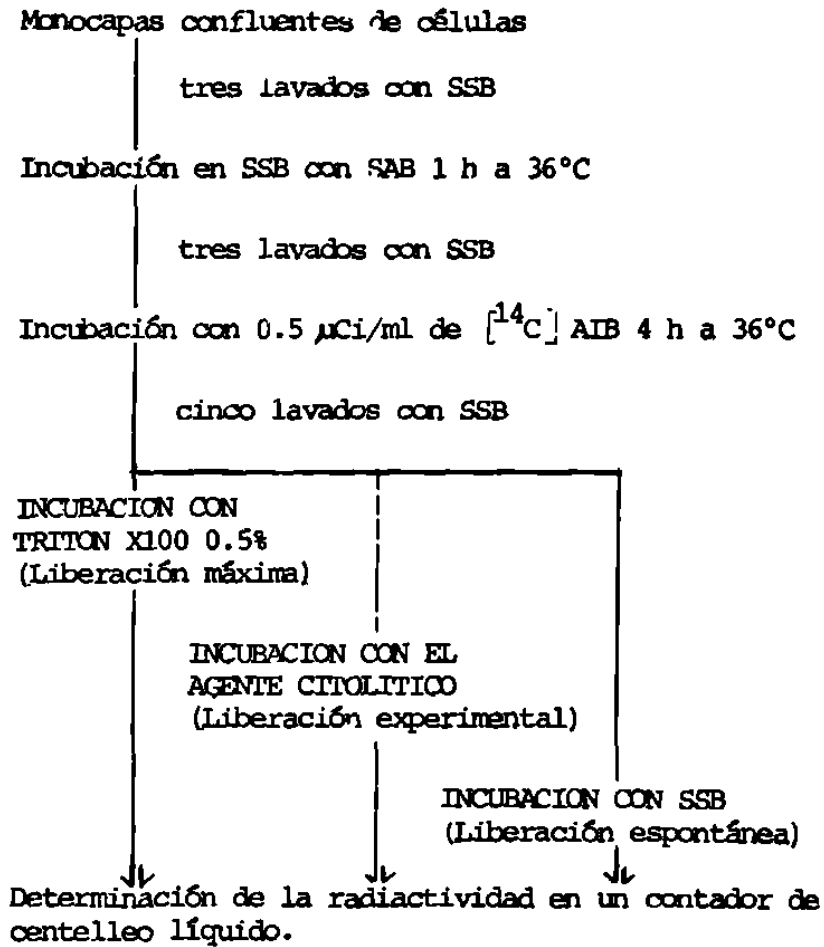


Fig. 2. Diagrama de flujo del modelo experimental.

tidades variables de P30 (equivalentes entre 28.75 y 460  $\mu\text{g}$  de proteínas totales) cuantificamos la radiactividad en: 1) las SE de los cultivos celulares y el producto de dos lavados con 50  $\mu\text{l}$  de SSB; 2) las células que desprendimos del substrato agregando 50  $\mu\text{l}$  de tripsina y el producto de dos lavados a los pozos de cultivo después de haber desprendido las células y 3) en el poliestireno de cada pozo de las microplacas que cortamos con un bisturí caliente; colocamos este material en viales para centelleo líquido, a los que agregamos 5 ml de líquido para centelleo, donde se disolvió el plástico. Determinamos la radiactividad en las SE y en las células como en los experimentos anteriores.

En la Fig. 3 esquematizamos el procedimiento que seguimos en la determinación de la radiactividad en los diferentes componentes del sistema de ensayo.

L. Determinación de la interferencia de la luminiscencia (porcentaje de apagamiento) en las mezclas de ensayo.

Tomamos la SE con la más alta concentración de proteínas de P30 utilizada en el experimento anterior (460  $\mu\text{g}$ ) y colocamos volúmenes entre 5 y 30  $\mu\text{l}$  de muestra en papeles filtro que secamos a 80°C en los viales para centelleo, luego agregamos 5 ml de líquido para centelleo y cuantificamos la radiactividad.

M. Preincubación de P30 con AIB no radiactivo.

Incubamos la P30 en su concentración final en presencia de AIB no radiactivo (2 mg/ml, concentración final 1X) 30 min antes de ponerla en contacto con los cultivos celulares.

N. Determinación de la radiactividad liberada de los cultivos celulares por efecto de P30.

Determinamos la radiactividad liberada por las células marcadas con [ $^{14}\text{C}$ ] AIB en las SE después de 8 min de contacto con cantidades variables de P30. Calculamos el %LES de la misma manera en que lo determinamos para el efecto del Tritón X100.

O. Determinación de la radiactividad liberada por efecto de P30 a tiempos variables de incubación.

Determinamos la radiactividad liberada por células marcadas con [ $^{14}\text{C}$ ] AIB incubadas por tiempos variables entre 0 y 8 min con 57.5  $\mu\text{g}$  de

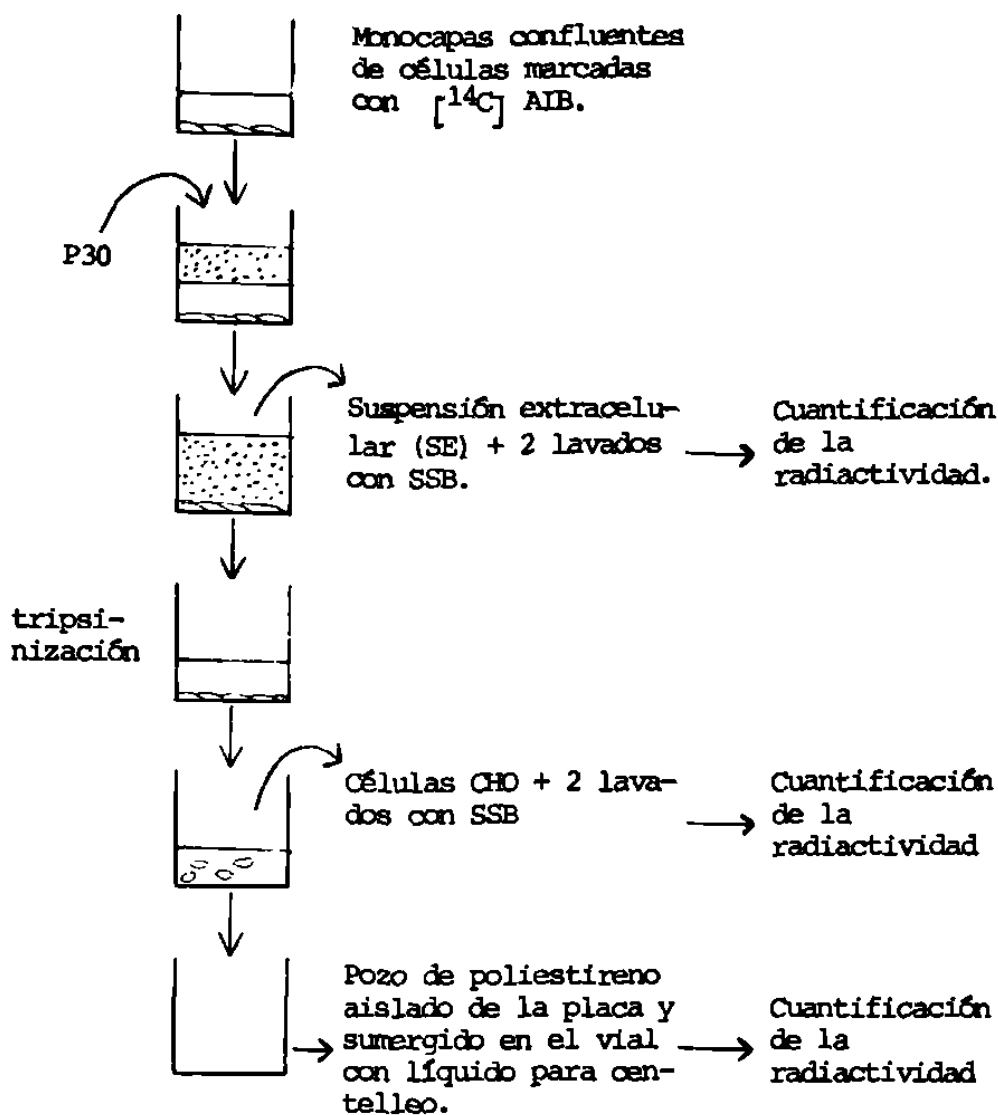


Fig. 3. Diagrama de los componentes del sistema de ensayo en que se cuantificó la radiactividad.



proteínas totales de P30 de HM38. Calculamos el %LES como se describió antes.

P. Microscopía en contraste de fases de los cultivos celulares tratados con P30.

Cultivamos células CHO sobre trozos de cubreobjetos de aproximadamente 3 mm por lado (previamente lavados por 24 h en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, luego 24 h en solución de ácido clorhídrico al 1% y finalmente 24 h en acetona, cambiándola dos veces y dejándola evaporar la última vez, los esterilizamos a 200°C por 3 h, y los colocamos en los pozos de las microplacas con pinzas estériles) dentro de los pozos de las microplacas.

Incubamos los cultivos por 8 min con P30 de HM38 (14.25 µg de proteínas totales), los lavamos y fijamos con gluteraldehído al 2.5%, inmediatamente después de tratarlos con P30 o SSB o después de reincubarlos por 18 h en medio McCoy fresco, adicionado con 15% de suero de ternera.

Obtuvimos las fotografías en un equipo de cámara y microscopio de contraste de fases Leitz Orthoplan (Alemania) a 500 diámetros de amplificación, colocando el cubreobjetos con el cultivo celular, sobre un portaobjetos, agregarle PBS y cubrirlo con otro cubreobjetos.

Q. Marcaje del DNA de los cultivos de células CHO con [<sup>3</sup>H] timidina.

En microplacas con 96 pozos de fondo plano, sembramos  $1.5 \times 10^4$  células por pozo en 200 µl de medio McCoy completo adicionado con 5 µCi/ml de [<sup>3</sup>H] timidina. Cubrimos las placas con películas transparentes y las incubamos por 24 h a 36°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Terminado el tiempo de incubación retiramos el medio y lavamos cinco veces con 100 µl de SSB (39).

R. Determinación de la captación de [<sup>3</sup>H] timidina por los cultivos celulares.

Determinamos la radiactividad en los cultivos celulares marcados con [<sup>3</sup>H] timidina después de reincubarlos por 24 h en medio McCoy completo y lisarlas con 25 µl de Tritón X100 al 0.5%, de la misma manera como lo describimos para la determinación de [<sup>14</sup>C] AIB.

S. Determinación de DNA-[<sup>3</sup>H] timidina liberada por los cultivos celulares.

res por efecto de P30.

A células marcadas con [ $^3\text{H}$ ]timidina las incubamos por 8 min con SSB o cantidades variables de P30 (equivalente entre 1.75 y 115  $\mu\text{g}$  de proteínas totales), las lavamos tres veces con 50  $\mu\text{l}$  de SSB y las reincubamos con 100  $\mu\text{l}$  de medio McCoy completo por 24 h a 36°C en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Determinamos la radiactividad en las SE de los cultivos reincubados y calculamos el porcentaje de LFS como lo describimos para la determinación de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB.

#### IV. RESULTADOS

##### A. ADECUACION DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA CUANTIFICAR ACTIVIDAD CITOLITICA.

La fracción vesicular amibiana P30 contiene varias clases de citolisinas. Una de ellas es probablemente una fosfolipasa A (15,16,17). Se ha postulado que una segunda es la 'amebaporo' (19,29) y nosotros encontramos indicios de que puede haber una tercera, de efectos más rápidos e irreversibles (31). Sin embargo el modelo para determinar esta última actividad requiere el uso de el ácido  $\alpha$ -[ $^{14}\text{C}$ ] amino isbutírico, un aminoácido no natural, de peso relativamente bajo, cuya anfotericidad ofrece una serie de problemas técnicos que era necesario detectar y resolver para que el modelo fuera útil en la cuantificación del efecto citolítico antes mencionado, lo cual a su vez es un requisito indispensable para caracterizar y purificar la citolisina putativa.

Por todo lo anterior, nos propusimos identificar cada uno de los problemas que impedían la cuantificación del efecto citolítico inmediato.

##### 1. Eliminación de la radiactividad inespecífica no captada por las células.

Una primera fuente de error en el modelo era la presencia de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB en las mezclas de ensayo que no había sido captado por las células. Por ello determinamos la radiactividad en el producto de una serie de lavados de los cultivos preincubados con [ $^{14}\text{C}$ ] AIB. Encontramos que la radiactividad no incorporada por las células era muy alta en el producto del primer lavado y disminuyó linealmente con los tres lavados siguientes, hasta que, en el volumen producto del quinto lavado, la luminiscencia detectada por el contador de centelleo líquido fue equivalente a la registrada en los testigos sin radiactividad añadida. Al lavar los cultivos también disminuyó linealmente la radiactividad depositada sobre las células. Después del cuarto lavado encontramos que la radiactividad detectada al lisar la monocapa celular se estabilizó con un total de 71,000 dpm  $\times 10^6$  células. Consideramos que dicha radiactividad correspondió al [ $^{14}\text{C}$ ] AIB captado por las células (Fig. 4).

##### 2. Liberación de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB por efecto del Tritón X100.

Para probar si nuestro modelo era útil para cuantificar la liberación de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB por efecto de un agente citolítico, utilizamos el Tritón X100 -un detergente no polar que disuelve la membrana plasmática-. Encontramos

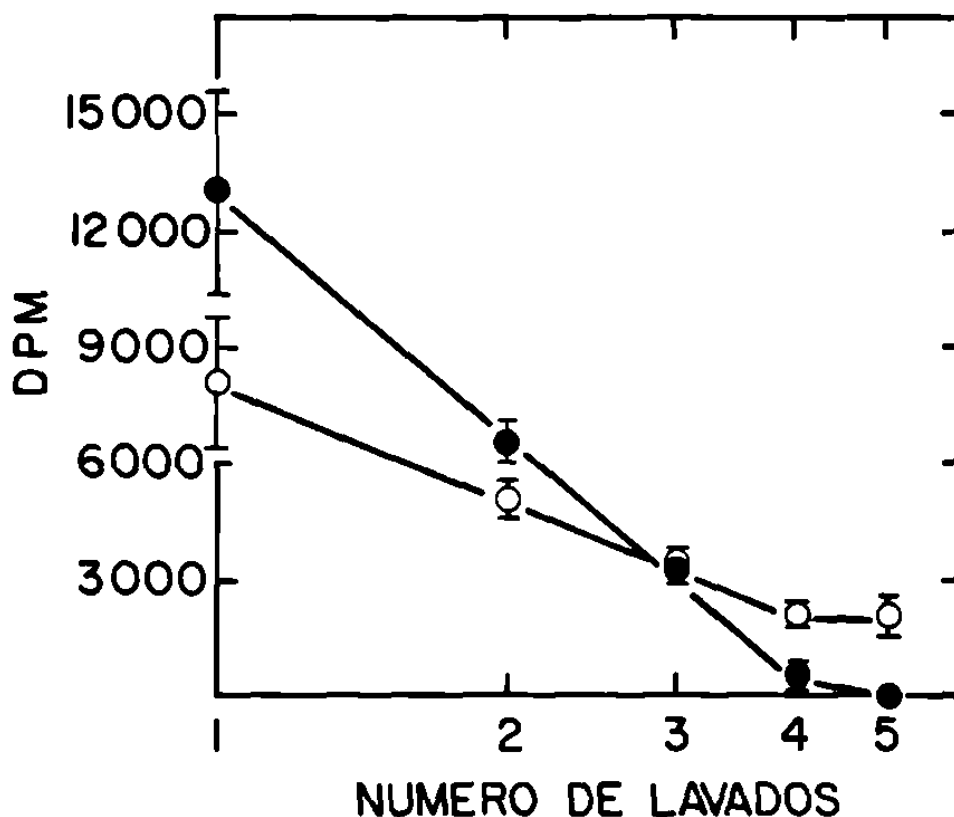


Fig. 4 Disminución de la radiactividad basal con respecto al número de lavados de los cultivos de células marcadas. Determinamos la radiactividad recuperada de los cultivos de células marcadas con  $[^{14}\text{C}]$  AIB después de lavar los cultivos de una a cinco veces con 100  $\mu\text{l}$  de SSB precalentado a 36°C. Los símbolos corresponden a la radiactividad recuperada en cada volumen de lavado (●) después de marcar las células, o en las células lisadas con Tritón X100 al 0.5% (○). Cada punto representa el promedio y (+) desviación estándar de tres determinaciones.

que la liberación del marcador radiactivo es una función semilogarítmica con respecto a la concentración de Tritón X100 entre 0.00125% y 0.04%. El 50% de liberación del marcador correspondió al 0.0074% de Tritón X100 (Fig. 5).

Los resultados anteriores nos permitieron confirmar que el modelo de citólisis con un agente potente y soluble era útil para cuantificar con precisión la liberación de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB. Sin embargo, aún quedaba por resolver el problema más difícil: la detección de citólisis producida por una citolisina fuertemente asociada a membrana, lo cual planteaba dificultades técnicas tales como apagamiento de luminiscencia e inmovilización indeseable del marcador sobre las células, substrato y la misma fracción membranal.

### 3. Distribución de la radiactividad en el sistema de ensayo en función de la cantidad de P30 agregada.

La radiactividad asociada a las células y al poliestireno, con que están fabricadas las microplacas donde hicimos las mezclas de ensayo, aumentó en función de la cantidad de P30 agregada, mientras que las dpm detectadas en la SE disminuyeron (Fig. 6). Lo anterior podría deberse a que el marcador liberado por las células lisadas se quedase adherido a las membranas plasmáticas y/o al poliestireno y por ello no apareciese en forma soluble en la SE, donde debía detectarse. Esta suposición se veía reforzada por las grandes desviaciones estándar que observamos en las determinaciones. Lo cual podría deberse a que los posibles complejos [ $^{14}\text{C}$ ] AIB-P30 o [ $^{14}\text{C}$ ] AIB-células lisadas se estuviesen desprendiendo del substrato en forma irregular, no controlable por el método de lavado que estábamos usando.

### 4. Bloqueo de los posibles sitios de unión para el [ $^{14}\text{C}$ ] AIB en el poliestireno de las microplacas, mediante preincubación de los cultivos celulares con seroalbúmina.

Cuando preincubamos los cultivos celulares en presencia de SAB observamos que la radiactividad asociada al poliestireno se redujo hasta un 91%, en relación a los pozos sin SAB y las variaciones en las determinaciones disminuyeron considerablemente. Esto permitió detectar la liberación del marcador por efecto citolítico de P30 en cantidades relativamente pequeñas (equivalente entre 0 y 57.5  $\mu\text{g}$  de proteínas totales). Sin embargo, con cantidades mayores de extracto (de 57.5 a 172.5  $\mu\text{g}$  de proteínas) las dpm detectadas disminuyeron 43%, para después estabilizarse hasta con

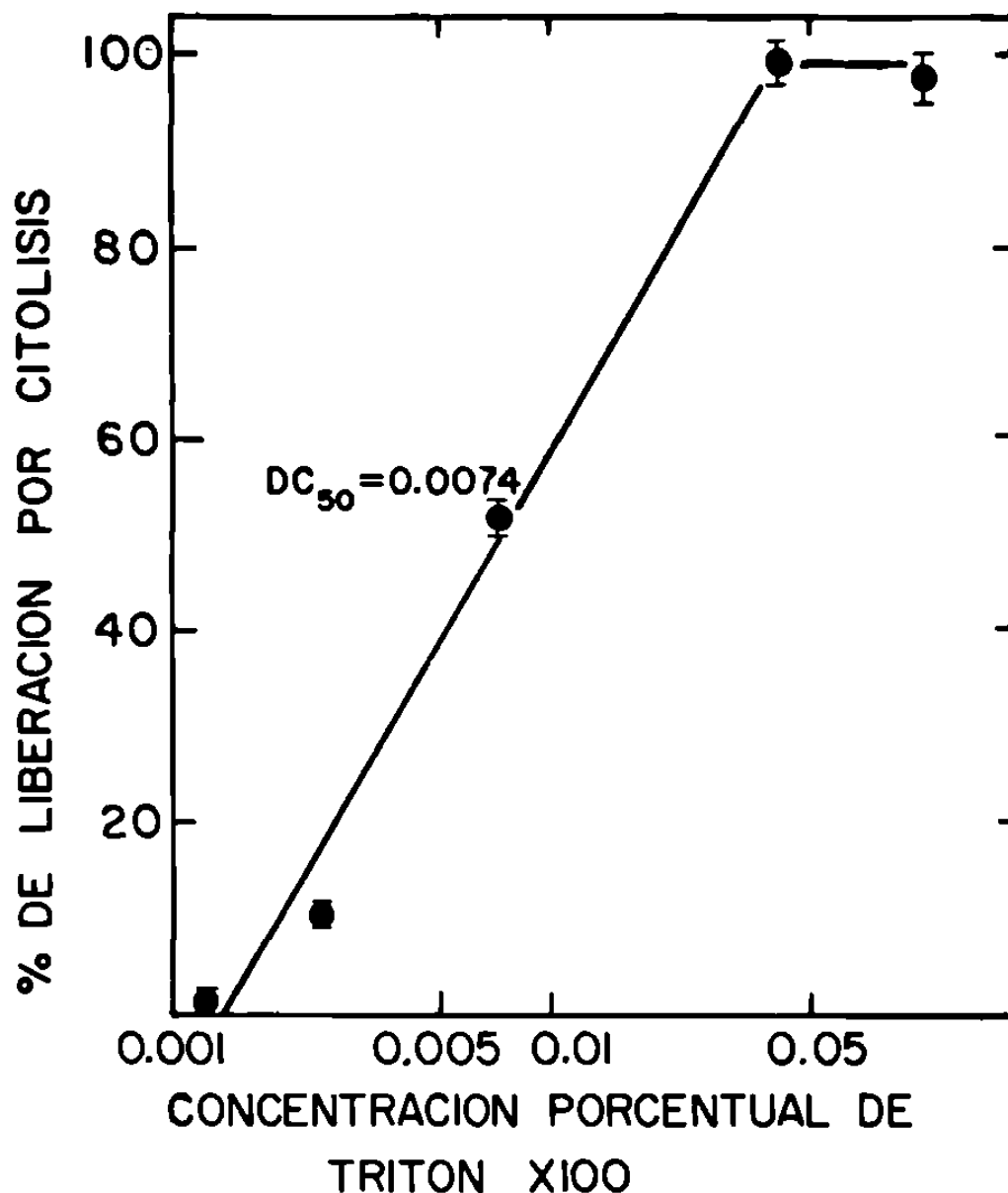


Fig. 5 Relación entre el porcentaje de liberación de [<sup>14</sup>C] AIB y la cantidad de Tritón X100 añadida a las mezclas de ensayo. Determinamos la radiactividad liberada por las células marcadas con [<sup>14</sup>C] AIB después de 8 min de incubación con cantidades variables de Tritón X100. El porcentaje de liberación del marcador correspondió a una relación semilogarítmica con respecto a la concentración de Tritón X100 con un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) 0.988. Por interpolación en la gráfica, la dosis que liberó el 50% del marcador radiactivo correspondió a 0.0074%. Cada símbolo representa el promedio y (+) desviación estándar de nueve determinaciones en tres experimentos independientes.

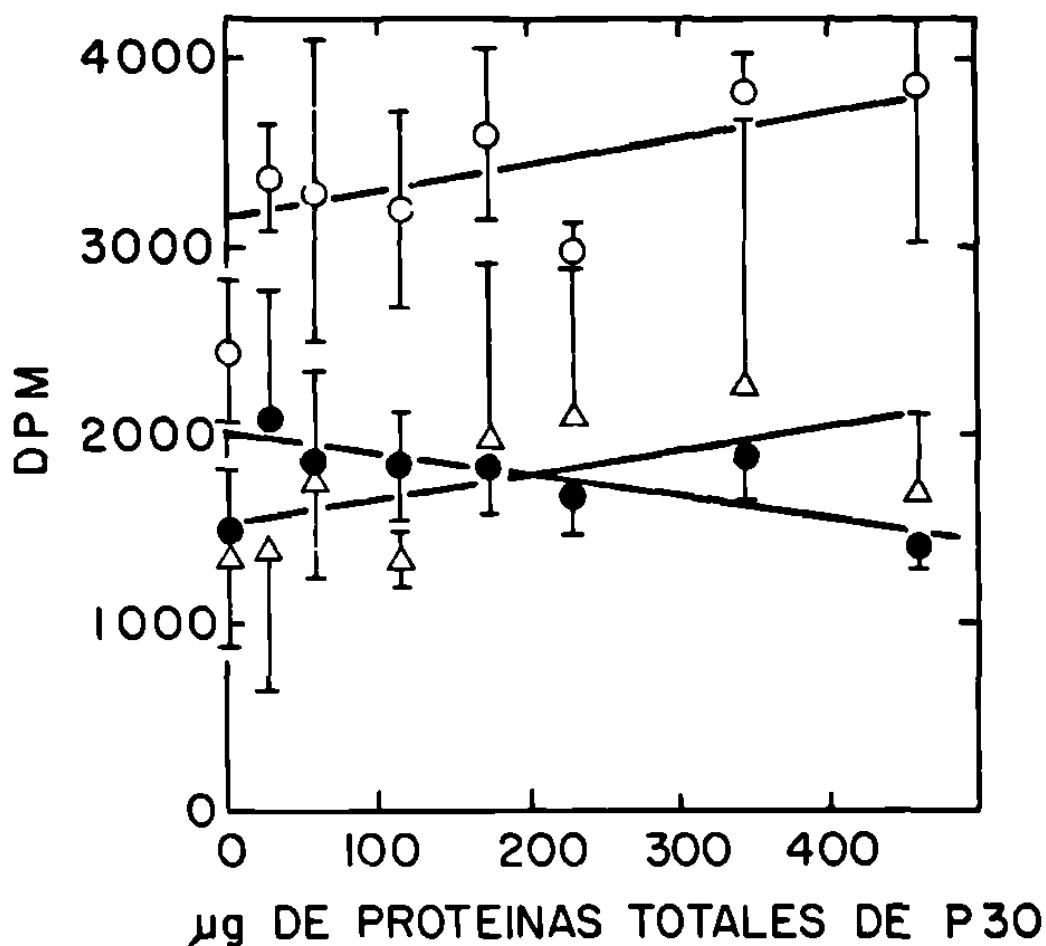


Fig. 6 Distribución de la radiactividad en función de la cantidad de P30 agregada al sistema de ensayo. Después de 8 min de incubación determinamos la radiactividad en los siguientes componentes de cada uno de los pozos del sistema de ensayo en las microplacas: 1) suspensión extracelular (SE, ●), compuesta por a) la P30 no adsorbida a las células o al sustrato y b) el producto de dos lavados sucesivos con 50 µl de SSB precalentado a 36°C; 2) las células CHO desprendidas del sustrato con tripsina y dos lavados sucesivos con 50 µl de SSB (○) y 3) el poliestireno con que está hecho cada pozo de las placas de microensayo, así como todas las partículas adsorbidas a este (Δ). Cada símbolo representa el promedio y (+) desviación estándar de tres determinaciones.

460 µg de proteínas totales ( Fig. 7).

La radiactividad detectada en las células se redujo en relación a la cantidad de P30 agregada entre 0 y 115 µg de proteínas totales, a partir de este punto la radiactividad aumentó en función de la cantidad de extracto añadido. Este resultado nos indicó que sí se liberaba [ $^{14}\text{C}$ ] AIB por el efecto lítico de P30, sin embargo sólo detectamos este efecto en las mezclas que tenían menor cantidad de extracto. Lo cual se debía a un efecto de apagamiento por exceso de proteínas en los cocteles de centelleo, como lo indicaría el siguiente experimento.

5. Incremento lineal de la interferencia de la luminiscencia (apagamiento) en función de la cantidad de P30. Solución al problema.

La presencia de algunas moléculas (como lípidos y proteínas) en las mezclas de centelleo dificultan la cuantificación de la radiactividad, porque ésta se detecta en el contador de centelleo líquido como emisión de luz, la cual puede ser absorbida o difractada por los compuestos antes mencionados. Como P30 es una fracción membranosa (25), rica en lípidos y proteínas, pensamos que la interferencia en la luminiscencia de las muestras analizadas podría ser relevante. Por ello decidimos determinar el apagamiento producido en el líquido de centelleo, en función del volumen de la SE de la mezcla de ensayo, correspondiente al pozo con mayor dosis de P30 (460 µg de proteínas) del experimento descrito en el inciso anterior. Al calcular las dpm/µl de cada muestra, encontramos una disminución lineal de la radiactividad detectada (apagamiento) en función del volumen de la mezcla de ensayo agregada a los frascos de centelleo líquido (Fig.8).

Para evitar el efecto de apagamiento, decidimos reducir la cantidad de P30 agregada a las mezclas de ensayo, así como preincubar la P30 con AIB no radiactivo para que este último bloqueara los sitios donde pudiera unirse el [ $^{14}\text{C}$ ] AIB. De esta manera esperábamos que el marcador liberado por las células por efecto de los extractos amibianos quedara soluble para poder cuantificarlo con precisión.

B. DETECCION DE UNA ACTIVIDAD CITOLITICA AMIBIANA DE EFECTO INMEDIATO.

6. Liberación de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB dependiente de la dosis de P30 añadida a cultivos de células CHO.

Una vez que adecuamos el modelo experimental para el análisis de efectos citolíticos muy finos, producidos por citolisinas asociadas a membra-



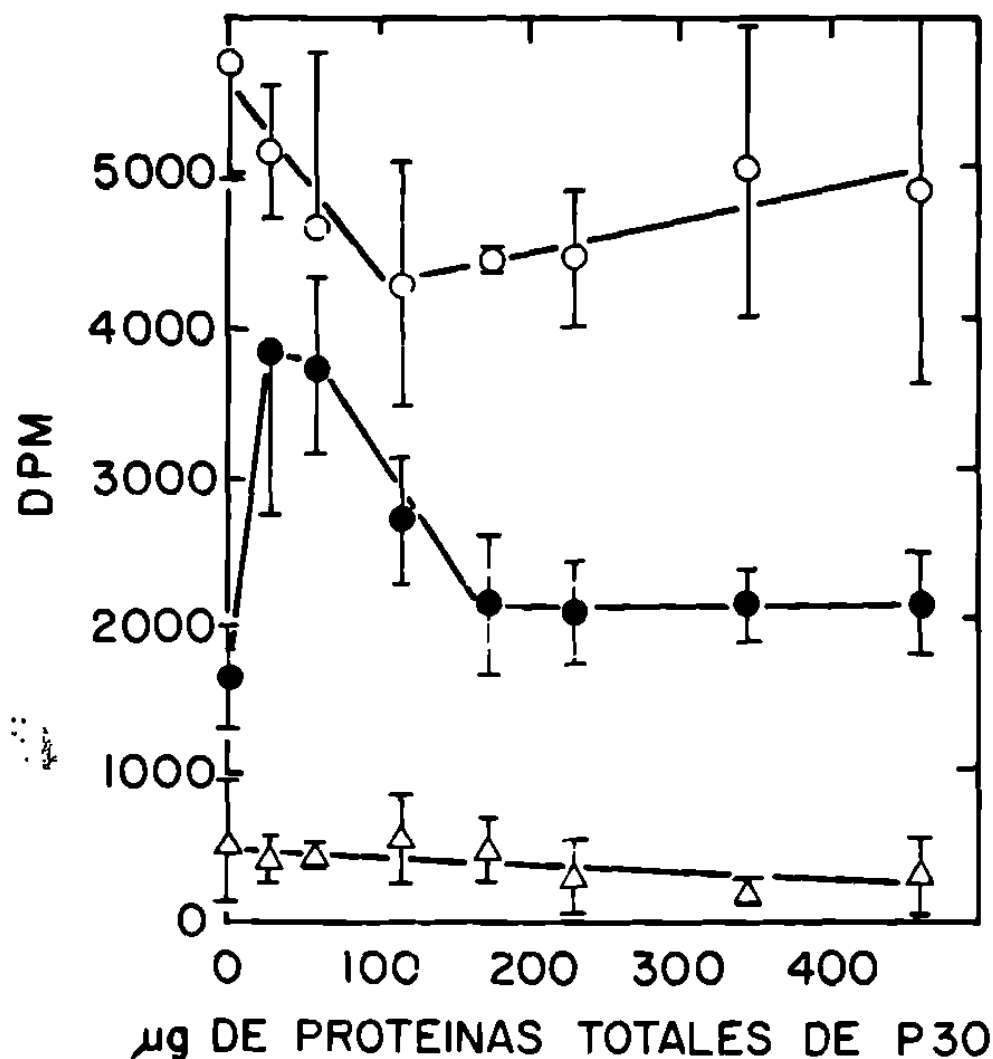


Fig. 7 Adecuación de la radiactividad en el sistema de ensayo,  
mediante la preincubación de los cultivos celulares con SAB. Incubamos los cultivos celulares en SSB adicionado con SAB (10 mg/ml) por 1 h a 36°C, antes de marcar los cultivos con [<sup>14</sup>C] AIB. Después continuamos el experimento en la forma usual (ver métodos) y determinamos la radiactividad en 1) la SE (●); 2) en las células (○) y 3) en el poliestireno de cada pozo (Δ), como se describió en el pie de la Fig. 3. Cada símbolo representa el promedio y (+) desviación estándar de tres determinaciones.

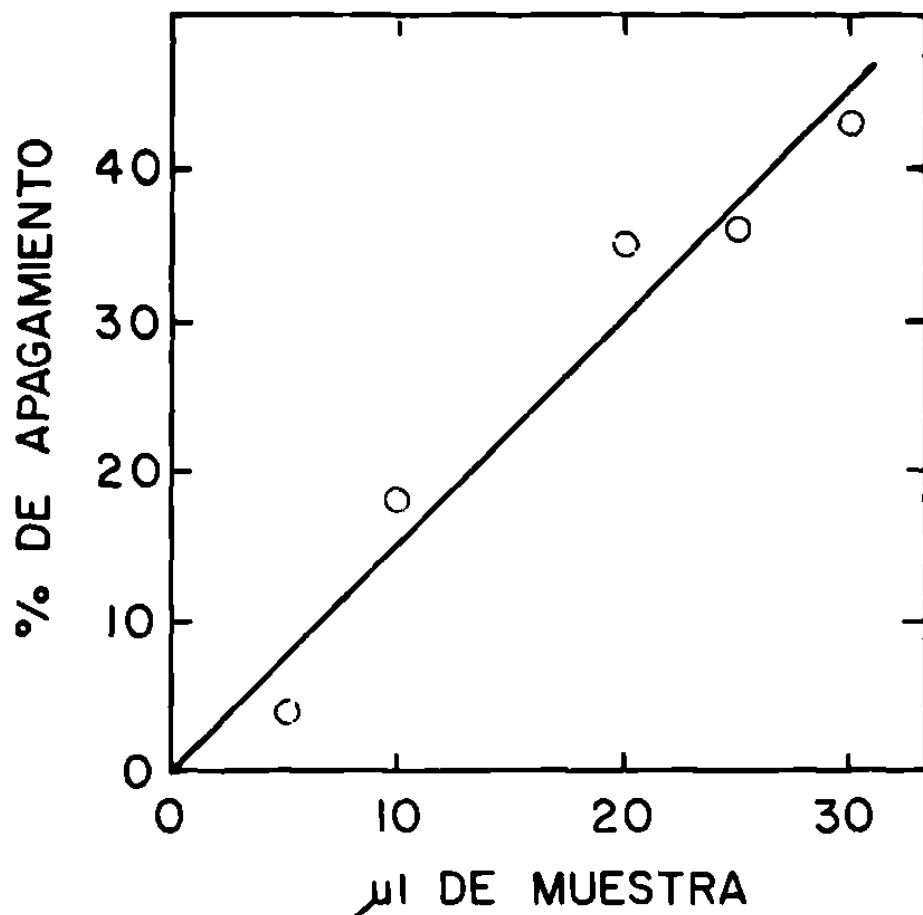


Fig. 8 Incremento lineal de interferencia de la luminiscencia (apagamiento) en función de la cantidad de P30. Determinamos la radiactividad en volúmenes variables (entre 5 y 30 µl) de SE de los pozos que contenían una cantidad de P30 equivalente a 460 µg de proteínas. Después calculamos las dpm/µl correspondientes a cada muestra y calculamos el intercepto del origen, es decir, las dpm que deberían detectarse en una muestra sin proteínas de P30 agregadas, pero con la misma radiactividad que las mezclas de ensayo. Tomamos este valor como el 100% de luminiscencia (0% de apagamiento). Con estos datos calculamos el porcentaje de apagamiento, el cual correspondió a una función lineal con respecto a la cantidad de P30 presente en los volúmenes de muestra cuantificados, con un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) 0.9503.

nas, probamos el efecto de la fracción P30, activada o fresca, de la cepa HK9. Encontramos que el porcentaje de liberación de  $[^{14}\text{C}]$  AIB correspondió a sendas funciones lineales con respecto a la dosis de P30. La pendiente de P30 activada fue mayor que la de la no activada.

El efecto citolítico máximo de P30 activada fue mayor que el de P30 fresca. Con una cantidad de extracto equivalente a 28.75  $\mu\text{g}$  de proteínas, la P30 fresca produjo una liberación específica del 21%, terminando en este punto la relación lineal, en tanto que una dosis equivalente de P30 activada produjo el 37% de liberación específica del marcador y la relación lineal se sostuvo hasta con 115  $\mu\text{g}$  de proteínas totales, la cual produjo una liberación específica de  $[^{14}\text{C}]$  AIB de 52%. Es decir, la P30 activada produjo una liberación máxima 2.4 veces mayor que la lograda con P30 fresca.

En los cultivos tratados con SAB, en vez de extractos amibianos, no observamos liberación significativa del marcador radiactivo (Fig. 9).

#### 7. Relación entre la virulencia de *E. histolytica* y la potencia citolítica de los extractos amibianos.

Una vez que cuantificamos la liberación del marcador por efecto de P30 de HK9, procedimos a comparar su potencia con la de la misma fracción de trofozoítos de HM38, otra cepa de *E. histolytica*, de mayor virulencia que HK9. Encontramos que las pendientes de ambas rectas son paralelas, pero su elevación es significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) (fig. 10). La potencia citolítica de la cepa HM38, fué 9 veces mayor que la de HK9 (Tabla I).

La P30 de hígado de rata solo produjo una ligera liberación de  $[^{14}\text{C}]$  AIB (6%) (Fig. 10).

#### 8. Liberación inmediata de $[^{14}\text{C}]$ AIB por efecto de P30.

Cuantificamos la liberación de  $[^{14}\text{C}]$  AIB por efecto de P30 de HM38 (cantidades equivalentes a 14.25  $\mu\text{g}$  de proteínas totales) después de 30 seg a 8 min de contacto con las células. Entre 0 y 2 min, el porcentaje de liberación específica del marcador fué un poco mayor del 30% con respecto a los testigos, para luego incrementarse linealmente en función del tiempo de incubación hasta los 8 min. Después de este último lapso de incubación, la liberación de  $[^{14}\text{C}]$  AIB fué aproximadamente del 50% con respecto a los testigos (Fig. 11).

#### 9. Lesiones membranales irreversibles producidas por P30 sobre células CHO.

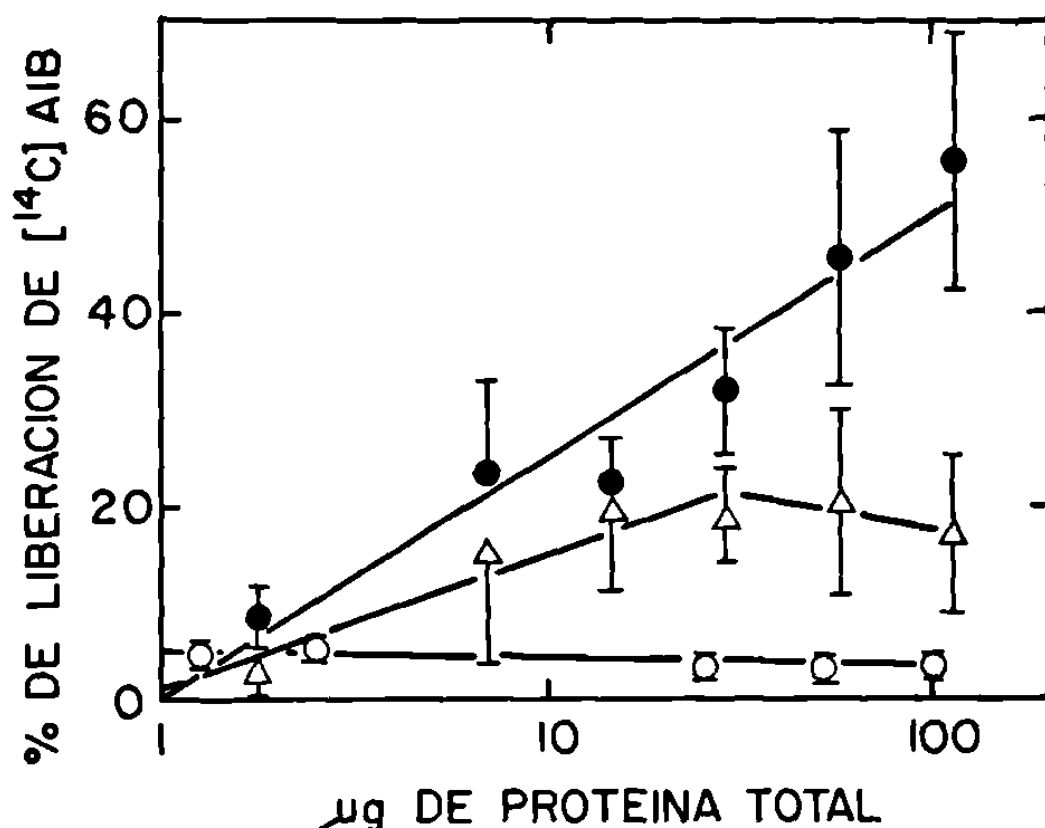


Fig. 9 Incremento del porcentaje de liberación de  $[^{14}\text{C}]$  AIB proporcional a la cantidad de P30 añadida al sistema de ensayo. Determinamos el porcentaje de liberación del marcador radiactivo en la SE de los cultivos celulares incubados por 8 min con cantidades variables de P30 preincubada por 30 h a  $36^{\circ}\text{C}$  (activada, ●); P30 no preincubada (fresca, Δ) y SAB (○). El porcentaje de liberación de  $[^{14}\text{C}]$  AIB correspondió a una función semilogarítmica con respecto a la cantidad de P30 añadida a los cultivos, expresada como  $\mu\text{g}$  de proteínas totales, con las siguientes correlaciones: con P30 activada 0.939 y con P30 fresca 0.850. Cada símbolo representa el promedio y (+) desviación estándar de nueve determinaciones en tres experimentos independientes.

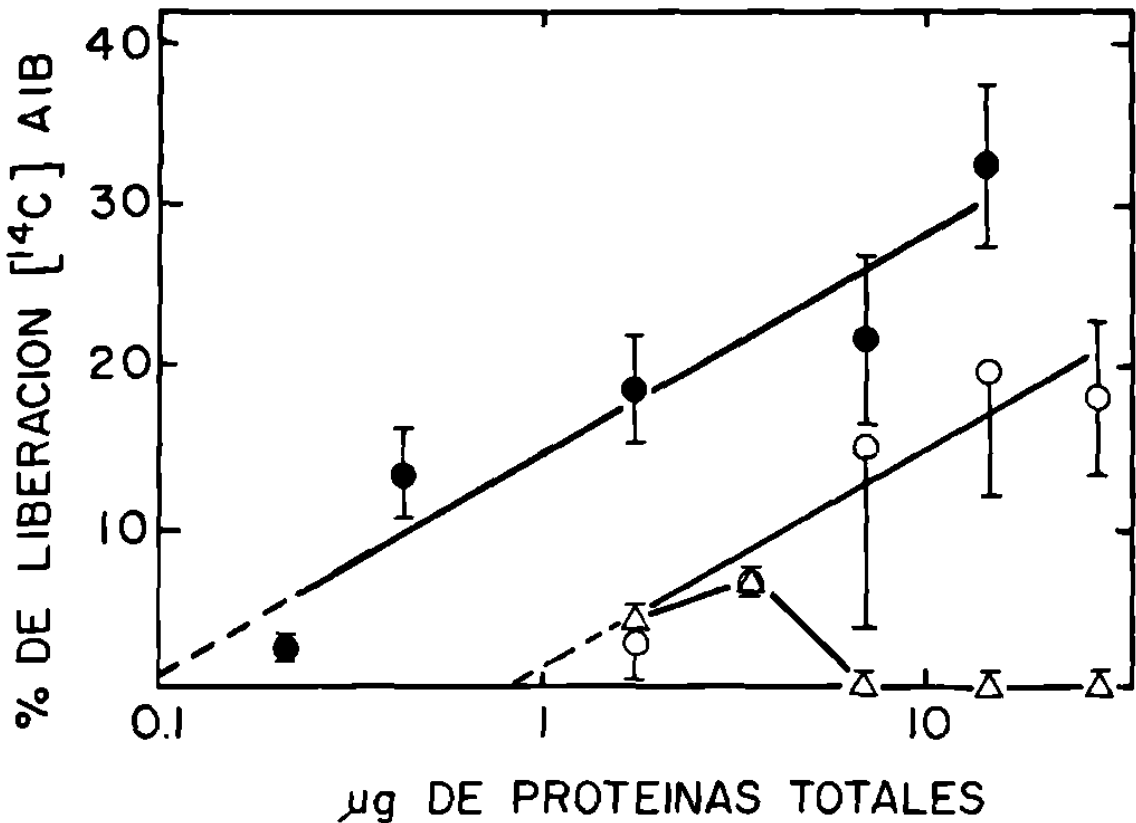


Fig. 10 Relación entre la virulencia de *E. histolytica* y la potencia citolítica de los extractos amebianos. Determinamos el porcentaje de liberación del marcador en la SE de cultivos celulares incubados por 8 min con cantidades variables de P30 de las cepas HM38 (●), una de las cepas más virulentas establecidas en cultivo axénico y HK9 (○), de menor virulencia y P30 de hígado de rata (Δ). Cada símbolo representa el promedio y (+) desviación estándar de tres determinaciones. Encontramos en los dos primeros casos que la liberación de  $[^{14}\text{C}]$  AIB es una función semilogarítmica de la cantidad de P30 añadida a las mezclas de ensayo, con los siguientes coeficientes de correlación ( $r^2$ ): Para P30 de HM38 (equivalente a cantidades entre 0.21 y 14.25  $\mu\text{g}$  de proteínas totales) 0.9036 y para P30 de HK9 (entre 1.75 y 28.75  $\mu\text{g}$ ) 0.850. La elevación de las rectas es significativamente diferente ( $p < 0.05$ ).

TABLA I

ACTIVIDAD CITOLITICA ESPECIFICA DE P30 DE DOS CEPAS DE Entamoeba histolytica CON DIFERENTE VIRULENCIA.

Cepa	Actividad específica	Actividad relativa
HK9	230 UC/mg	1.00
HM38	2128 UC/mg	9.25

1 unidad citolítica (UC) =  $\mu$ g de proteínas totales de P30 necesarias para liberar el 10% de [ $^{14}$ C] AIB en 8 min de incubación, calculando el porcentaje de liberación específica del marcador (%LES) como se indica en métodos.

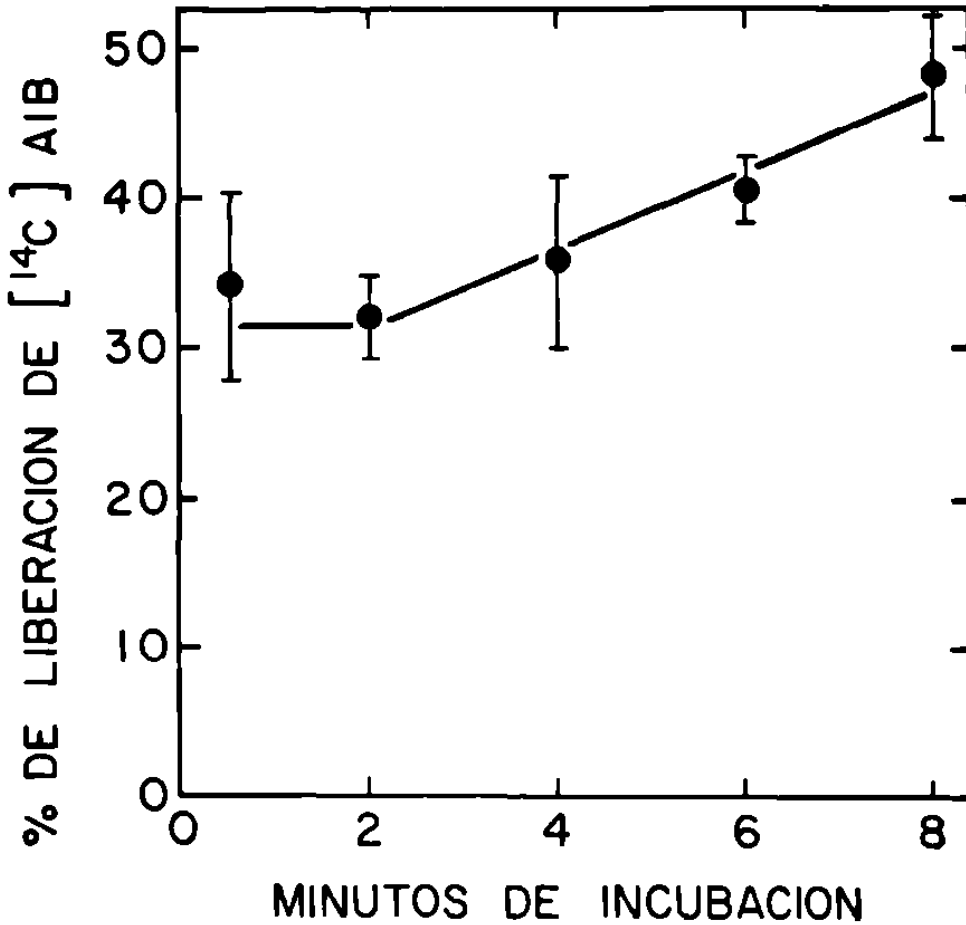


Fig. 11 Liberación inmediata de  $[^{14}\text{C}]$  AIB por efecto de P30. A tiempos variables de incubación (entre 30 seg y 8 min) determinamos el porcentaje de liberación del marcador radiactivo en la SE de los cultivos celulares tratados con una cantidad equivalente a 14.25  $\mu\text{g}$  de proteínas totales. Los símbolos representan el promedio y (+) desviación estándar de tres determinaciones.

En cultivos celulares tratados con P30 de HM38 (14.25  $\mu\text{g}$  de proteínas totales) por 8 min (Fig. 12B) observamos que las células sufrieron los siguientes cambios morfológicos: a) hinchamiento; b) aumento del número y tamaño de sus vacuolas y c) aparición de protusiones membranales. Lo cual no sucedió con los cultivos testigo (Fig. 12A). Las lesiones anteriores fueron irreversibles, pues aún después de lavar los cultivos con un amortiguador isotónico de pH 7.2 y reincubarlos en medio McCoy fresco, adicionado con 15% de suero de ternera, las células mostraron lesiones todavía más acusadas que las iniciales y muchas de ellas se lisaron (Fig. 12C y D). Las lesiones antes descritas fueron localizadas, es decir, se afectó sólo un área delimitada de la membrana plasmática, al principio imperceptible, que luego evolucionó hasta lisar a las células que entraron en contacto con la citolisina (Fig. 12D).

#### 10. Liberación de DNA- $^3\text{H}$ timidina a largo plazo por efecto de P30.

Los resultados antes presentados sugieren que numerosas células se destruyen completamente después de haber sido tratadas con los extractos amibianos por corto tiempo de contacto y reincubarlas en medio fresco. Para confirmar esta apreciación, cuantificamos la salida de  $^3\text{H}$  timidina incorporada al DNA después de la reincubación. Lo cual sería evidencia de lesiones en la membrana plasmática de tal extensión que permitiesen la salida de macromoléculas e inclusive núcleos completos. Efectivamente, encontramos una relación lineal entre la liberación de DNA- $^3\text{H}$  timidina y la cantidad de P30 añadida a las mezclas de ensayo (equivalente entre 1.75 y 115  $\mu\text{g}$  de proteínas totales), después de 24 h de reincubación en medio fresco con suero tras el contacto por 8 min con P30 (Fig. 13).



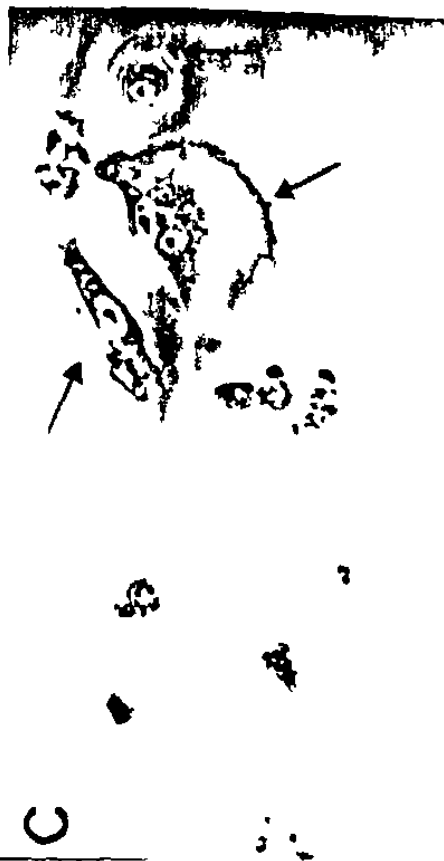


Fig. 12 Lesiones membranales irreversibles producidas por P30 sobre células CHO. Obtuvimos las micrografías en un microscopio de contraste de fases, a una amplificación de 500 diámetros. Las imágenes representan a cultivos testigos no tratados (A), a cultivos incubados por 8 min con P30 de la cepa FM38 (B), a las cuales terminado el tratamiento, lavamos con SSB y los reincubamos en medio McCoy fresco adicionado con 15% de suero de ternera, por 18 h a 36°C (C y D). Las flechas indican en B y C protusiones de las membranas celulares y en D, lisis celular.

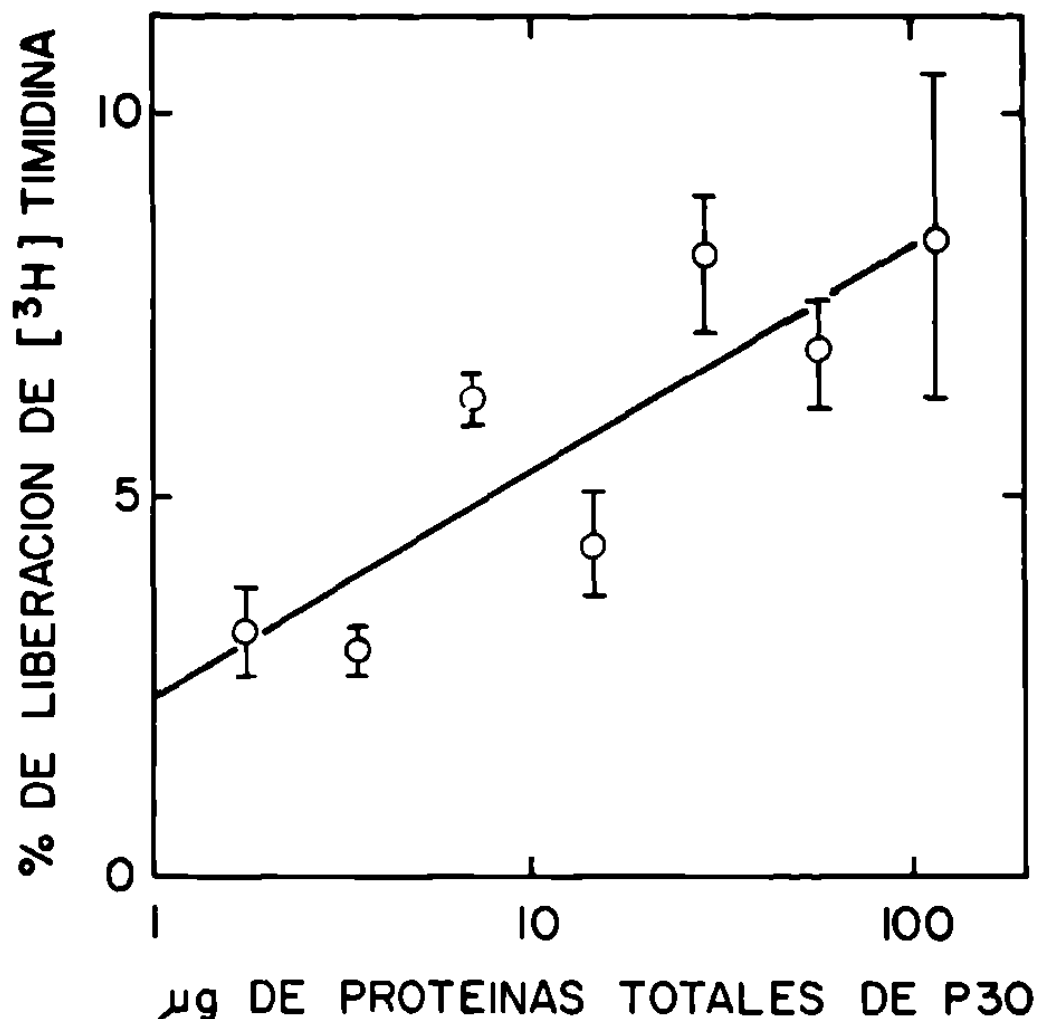


Fig. 13 Relación entre el porcentaje de liberación de DNA- $[^3\text{H}]$  timidina y la cantidad de P30 en las mezclas de ensayo. Determinamos el porcentaje de liberación del marcador radiactivo en las SE de los cultivos celulares después de incubarlos por 8 min con cantidades variables de P30 de HK9 (equivalente entre 1.75 y 115  $\mu\text{g}$  de proteínas totales), lavarlas y reincubarlas por 24 h a 36°C en medio McCoy completo. El porcentaje de liberación de DNA- $[^3\text{H}]$  timidina correspondió a una función semilogarítmica con respecto a la cantidad de P30, con un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) 0.7487. Cada símbolo representa el promedio y (+) desviación estándar de cuatro determinaciones.

## V. DISCUSION

La citólisis mediada por contacto ha sido considerada como uno de los factores más importantes en la patogenia de la amibiasis (33), sin embargo la gran mayoría de los investigadores que la han descrito no han podido detectarla en extractos amibianos. López-Revilla y Said-Fernández (24) descubrieron que los extractos libres de trofozoítos tienen actividad hemolítica. Prasad et al confirmaron este hallazgo (27). Poco después, Vargas-Villarreal y Said-Fernández (28) detectaron actividad lítica sobre células CHO en la misma fracción amibiana (P30) con mayor actividad hemolítica (25), la cual fué activada por incubación a 36°C por 30 h. El efecto anterior era claramente visible después de tiempos relativamente largos ( de 1 a 4 h) de contacto entre las células y los extractos amibianos. Recientemente nosotros observamos un efecto citolítico sobre células CHO después de tiempos de contacto muy cortos (de 15 seg a 10 min). El cual se manifestaba sin necesidad de activar la fracción P30 (31). Por ello pensamos que este último efecto podría deberse a un factor diferente al descrito por Vargas-Villarreal Y Said-Fernández (28). Sin embargo no tuvimos éxito en los primeros intentos para obtener datos cuantitativos del efecto recién descubierto. Ello se debió a la anfotericidad del [ $^{14}\text{C}$ ] AIB, propuesto como marcador para denotar lesiones membranales tempranas y muy finas, producidas por diversas citolisinas solubles (32). Adicionalmente P30 es una fracción membranal opaca, muy rica en proteínas y lípidos, características físicas que dificultaron grandemente la cuantificación del efecto recién descubierto. A pesar de todas las dificultades antes mencionadas, decidimos adecuar el modelo cuantitativo de citólisis con P30 y [ $^{14}\text{C}$ ] AIB, porque la citólisis observada después de tiempos cortos de contacto podría estar estrechamente relacionada con la citólisis mediada por contacto. La cual también ocurre a tiempos muy cortos (8). El trabajo aquí presentado constituye, además, un prerrequisito para intentar la purificación de la citolisina descubierta y analizar su importancia en la patogenia de la amibiasis.

Iniciamos nuestra estrategia de trabajo eliminando del sistema toda la radiactividad que no había sido captada por las células y quedaba soluble en el sistema. Para ello determinamos el número mínimo de lavados de los cultivos celulares recién marcados con [ $^{14}\text{C}$ ] AIB para reducir la radiactividad inespecífica al mismo nivel que la radiactividad basal (Fig. 4).

El siguiente paso en el desarrollo del modelo fué probarlo con un agen-

te citolítico soluble, cuyos efectos fueran bien conocidos. Elegimos al Tritón X100, que forma parte de los agentes líticos analizados por Thelestam y Mollby (32). Con ello encontramos que el modelo ya era útil para cuantificar con precisión la liberación de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB por efecto de un agente lítico (Fig. 5) sin problemas adicionales como los de P30.

Después de lo anterior abordamos el principal problema de nuestro modelo: detectar actividad de una citolisina fuertemente asociada a membrana en muestras opacas, muy ricas en proteínas y lípidos. Hicimos un análisis global del sistema de ensayo, para identificar los sitios de unión inespecífica del [ $^{14}\text{C}$ ] AIB, después de la citólisis producida por P30. Los resultados de tal análisis nos indicaron que el marcador se unía en forma muy importante al poliestireno de los pozos de las microplacas y probablemente a la superficie de las células, directamente, por sí sólo, o indirectamente como complejo P30- $^{14}\text{C}$  AIB, a juzgar por el incremento de radiactividad detectada con respecto a la dosis de P30, en tales componentes de ensayo (Fig. 6). Una vez identificados éstos problemas, intentamos bloquear los posibles sitios de unión del [ $^{14}\text{C}$ ] AIB en el poliestireno y en la membrana plasmática de las células CHO: Preincubamos los cultivos celulares con SAB, sabiendo que la SAB es una proteína compuesta por aminoácidos cuyas cargas son muy parecidas a las del aminoácido que estábamos empleando como marcador. Encontramos que nuestra hipótesis era correcta: la unión del marcador al poliestireno se redujo hasta en un 91%, con desviaciones estándar considerablemente menores que las obtenidas en experimentos anteriores ( Figs. 6 y 7).

En el experimento de la Fig. 7 encontramos que la radiactividad detectada en las células disminuyó en relación a las dosis más bajas de P30, para luego incrementarse con respecto a la dosis de P30. La primera parte de la curva sugirió que el [ $^{14}\text{C}$ ] AIB sí se liberaba por el efecto citolítico de P30, pero por otro lado, la disminución de la radiactividad soluble en las suspensiones extracelulares de las mezclas de ensayo con dosis mayores de P30 sugería fuertemente un efecto de apagamiento de la luminiscencia, evitando que pudiera cuantificarse con precisión la real cantidad de marcador liberado de las células. Esta suposición fué confirmada en el experimento de la Fig. 8.

Para solucionar este problema redujimos la dosis de P30 utilizada y agregamos a P30, antes del ensayo, AIB no radiactivo, para bloquear los sitios de unión en P30 del [ $^{14}\text{C}$ ] AIB liberado de las células y quedara

soluble para poder cuantificarlo.

Con todas las modificaciones introducidas consideramos que nuestro modelo de ensayo ya era adecuado para cuantificar actividad citolítica en los extractos amibianos. Pasamos entonces a la segunda etapa del trabajo que consistió en determinar el efecto citolítico de la fracción P30, sobre células CHO premarcadas con [ $^{14}\text{C}$ ] AIB.

Incluimos en estos análisis P30 activada mediante preincubación a 36°C por 30 h, la cual tiene efectos citolíticos comprobados (28). Como tuvimos éxito con ella, pasamos al problema central del trabajo: cuantificar el efecto de P30 "fresca", no activada. Como puede verse en la Fig. 9, dicha fracción tiene, en efecto, una citolisina cuyo efecto es dependiente de la dosis y se manifiesta en tiempos muy cortos. El efecto de P30 activada fué 2.4 veces mayor que el de P30 fresca. Lo cual era predecible porque P30 activada contiene además fosfolipasas activadas y sus productos de hidrólisis acumulados, cuyo potente efecto citolítico es bien conocido (26). Por otro lado, la SAB en dosis equivalentes a las de P30 fresca o activada no produjo liberación del marcador (Fig. 9). Lo que significa que la liberación de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB es específica de citolisinas amibianas.

Una vez que contamos con un modelo confiable para cuantificar el efecto citolítico de P30 a tiempos cortos de contacto, comparamos la potencia de P30 de HK9 con la de la cepa HM38, de mayor virulencia que HK9. La potencia de HM38 fué un poco más de 9 veces mayor que la de HK9, lo cual significa que la potencia citolítica de E. histolytica guarda relación con su virulencia. Encontramos además que las pendientes de las relaciones dosis-respuesta son iguales en las dos cepas, pero con una elevación significativamente diferente ( $p < 0.05$ ; Fig. 10). La pendiente idéntica sugiere que la actividad lítica del efecto a corto plazo se debe al mismo factor en sendas cepas; la diferente altura indica que dicho factor se encuentra en mayor cantidad en HM38, la cual es precisamente la cepa más virulenta. Ello podría significar que la citolisina cuyos efectos describimos, es un factor de virulencia de E. histolytica.

Por otro lado, la liberación máxima producida por efecto de P30 de hígado de rata fué muy pequeña (6%) en comparación con las fracciones amibianas, el efecto lítico se explica porque se trata de una fracción lisosomal que contiene un gran número de enzimas hidrolíticas, sin embargo su potencia es notablemente menor que la de los extractos amibianos. Lo cual

sugiere además, que el efecto detectado por nosotros no se debe exclusivamente a actividades enzimáticas, sino a otro mecanismo. Porque a diferencia de lo que nosotros encontramos, las enzimas requieren tiempos considerablemente más largos para producir citólisis detectable.

Cuando cuantificamos la liberación de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB por efecto de P30 de HM38 en relación al tiempo, encontramos que desde los 30 seg de contacto hubo una liberación del 30% del marcador, la cual se mantuvo hasta los 2 min para luego incrementarse linealmente y llegar aproximadamente al 50% a los 8 min. Estos resultados significan que la lisis se produce tan pronto como la citolisina entra en contacto con las células blanco. Es decir, la citolisina que analizamos tiene un efecto inmediato. Tal descubrimiento apoya nuestra posición inicial, acerca de que el factor que nos ocupa no es una enzima, las cuales tienen una cinética muy diferente a la encontrada por nosotros. El efecto inmediato sugiere también que dicho factor podría ser un elemento muy importante en la citólisis rápida mediada por contacto, observada en trofozoítos enteros. La posible importancia de este efecto en la virulencia amibiana está fuertemente apoyada por la descripción de Treviño García-Manzo y Cruz de Lavin, quienes describieron lesiones producidas por trofozoítos enteros sobre epitelio intestinal aislado de cobayo (40) muy parecidas a las lesiones observadas por nosotros.

Las imágenes fotográficas presentadas en este trabajo (Fig. 12), nos permiten observar que las lesiones producidas en las células ocurren rápidamente, observándose un aumento de tamaño y número de las vacuolas, hinchamiento y aparición de protusiones membranales en las células tratadas con P30. Estas células después de lavarlas y reincubarlas no se recuperaron, sino que las lesiones aumentaron en gravedad provocando la lisis de algunas células. Es de hacerse notar que las lesiones descritas fueron localizadas. Es decir, afectaron sólo un área delimitada de la membrana, poco notable al principio, que luego evoluciona hasta lisa a la célula. En los cultivos tratados también pueden observarse células intactas, al lado de otras claramente lesionadas. Esto hace suponer que la citolisina se consume una vez que se integra a la membrana celular y produce su efecto y que hay un número limitado de éstas moléculas, contrariamente a como actúan las enzimas. Ello también apoya nuestra suposición de que se trata de una citolisina no enzimática. Muy probablemente se trate de una citolisina lábil al oxígeno, dependiente de grupos

-SH, por las siguientes razones: 1) las citolisinas de este tipo, como la estreptolisina O, se inactivan en presencia de oxígeno, y los grupos que han intentado detectar actividad citolítica en extractos amibianos, sonicaban las fracciones mezclandolas fuertemente con oxígeno, por lo que no se detecta una actividad semejante; 2) También, estas citolisinas se reactivan con agentes reductores tales como la cisteína. Cuando añadimos cantidades variables de cisteína a las mezclas de ensayo encontramos una dependencia clara del efecto citolítico con la cantidad de cisteína añadida. Con  $6.2\mu\text{M}$  de cisteína la actividad se incrementó hasta cinco veces con respecto a las mezclas sin el reductor (datos no presentados); 3) La estreptolisina O se inactiva cuando se preincuba en presencia de colesterol (el sitio de unión de esta toxina en las células blanco es ese lípido) (41), nosotros encontramos lo mismo cuando preincubamos P30 con colesterol (datos no presentados); 4) Las lesiones producidas por estreptolisina O (42) son muy parecidas a las que observamos en las células tratadas con P30; 5) La estreptolisina O no es una enzima, sino una molécula que produce citólisis uniéndose físicamente a la membrana plasmática para hacer agujeros, como lo sugieren nuestros datos en el caso de la citolisina amibiana; 6) Las condiciones del microambiente del intestino donde se desarrolla *E. histolytica* son anaerobias, por lo que sería factible y lógico que tuviera este tipo de citolisinas.

Como las lesiones, observadas por microscopía, producidas por efecto de P30 fueron irreversibles, cuantificamos este efecto en cultivos lavados después del contacto con P30 y reincubados en medio fresco, adicionado con suero. Para ello determinamos la liberación de [ $^3\text{H}$ ] timidina incorporada al DNA de células CHO, ya que la liberación de tal molécula implica la destrucción total de las células. Encontramos una liberación aproximada del 8%. Lo cual está de acuerdo con lo observado inicialmente: Muchas de las células permanecen intactas, en tanto que otras se lisan. Las lesiones de estas últimas son imperceptibles al principio, pero detectables por la liberación de [ $^{14}\text{C}$ ] AIB, estas lesiones progresan hasta lisar sólo a las células que entraron en contacto con la citolisina. De esta observación podemos colegir que aunque P30 está formada por vesículas y estas entran en contacto con todas las células, sólo algunas de tales vesículas contienen la citolisina de efecto inmediato, pues sólo algunas células se lisan. Dicho efecto es notablemente potente, considerando que corresponde a una fracción muy cruda, es decir, la citolisina está muy poco concentrada, y no se encuentra

en sus mejores condiciones de ensayo. A pesar de esto, el efecto de citólisis no difiere mucho del producido por citolisinas puras de veneno de serpiente, donde la liberación máxima de RNA- $^{[3]H}$  uridina es del 33% (43).

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten suponer que hemos descubierto una citolisina de E. histolytica, diferente a las descritas hasta ahora. Ya hemos discutido las diferencias entre la citolisina referida y las enzimas como fosfolipasas. Las diferencias con la proteína formadora de poros (amebaporo) son las siguientes: 1) la amebaporo produce un flujo selectivo de cationes monovalentes a través de la membrana celular y 2) las células se recuperan después del tratamiento con la amebaporo, es decir, su efecto es reversible. En tanto, la citolisina detectada en este trabajo produce lesiones que permiten la salida inmediata de una molécula mucho más grande que los iones, un aminoácido (PM:104) con cuatro grupos relativamente voluminosos, dos de ellos cargados con cargas opuestas ( $NH_2^+$  y  $COO^-$ ) y dos grupos hidrofóbicos ( $CH_3$ ). Estos efectos se agravan con el tiempo, hasta el grado de permitir la liberación de DNA. Es decir, a diferencia de la amebaporo, la citolisina aquí descrita produce lesiones más grandes, no selectivas a cargas, progresivas y mortales, a pesar de que las células se reincuban en presencia de suero, cuyas propiedades antitóxicas son bien conocidas.

#### Conclusiones.

El modelo desarrollado en este trabajo permite la cuantificación de efectos citolíticos muy finos, producidos por citolisinas asociadas a membrana, en tiempos muy cortos de contacto.

Por los resultados obtenidos, sugerimos la detección de una citolisina en extractos de trofozoítos de E. histolytica de efecto inmediato e irreversible y de acción localizada, lo cual corresponde a una citolisina no descrita hasta ahora.

La rapidez del evento y la relación encontrada entre la potencia de la citolisina propuesta para liberar el  $^{[14]}$  AIB y la virulencia de las cepas analizadas en este trabajo sugieren que dicha citolisina podría desempeñar una importante función en la citólisis mediada por contacto; y por lo tanto, en la virulencia amibiana.

#### Perspectivas.

El desarrollo de modelos experimentales como el descrito en este trabajo proporciona un medio para la exploración de nuevas actividades y fac-



tores que estén implicados en la patogenia de enfermedades infecciosas. Así mismo permiten hacer el seguimiento de la actividad durante el aislamiento y purificación del factor responsable.

En el campo de la amibiasis, el encontrar una actividad en extractos libres de células constituye un avance en el conocimiento de los factores involucrados en la virulencia amibiana. Los hallazgos aquí presentados refuerzan la hipótesis de que el mecanismo citolítico no se debe a un sólo factor, sino que entran en juego varios de ellos, y probablemente otras condiciones que no han sido determinadas hasta ahora. Entre los factores mencionados, la citolisina de efecto inmediato pudiera jugar un papel relevante.

Por otro lado, el modelo desarrollado aquí permitirá detectar y analizar citolisinas asociadas a fracciones membranales en otros especímenes, superando los inconvenientes que supone la anfotericidad y las propiedades físicas del marcador, así como la opacidad y complejidad bioquímica de las fracciones membranales.

## VI. RESUMEN

La amibiasis es la infección parasitaria ocasionada por Entamoeba histolytica. En México es un problema muy importante por su frecuencia y mortalidad.

La virulencia de E. histolytica depende esencialmente de la invasividad, propiedad en la que parece desempeñar un papel relevante la citólisis mediada por contacto, la cual ha sido descrita extensamente en trofozoítos activos. Sin embargo la mayoría de los esfuerzos para detectar actividad citolítica en extractos amibianos han sido infructuosos. Lo cual es condición indispensable para intentar la purificación de las citolisinas responsables.

En 1980, se encontró que los extractos amibianos tienen actividad hemolítica y la mayor parte de ésta actividad reside en la fracción vesicular llamada P30, cuya potencia basal se incrementa hasta cien veces después de 36 h de preincubación a 36°C.

En 1984 se detectó actividad citolítica de la fracción P30, activada por preincubación a 36°C por 30 h, sobre células CHO. La detección se realizó mediante la cuantificación de la radiactividad liberada por células CHO marcadas con [<sup>3</sup>H] UTP después de incubarlas con cantidades variables de P30 a 36°C por 4 h.

Posteriormente nosotros observamos que la fracción P30 produjo lesiones en células CHO desde los 15 seg de contacto. Estas lesiones se hacían más notables, aún después de lavar los cultivos celulares y reincubarlos en medio fresco adicionado con suero, hasta que algunas células terminaban por lisarse. La rapidez del evento y el hecho de que la P30 utilizada no fué activada, nos hizo suponer que el efecto citolítico se debía a un factor diferente al encontrado en P30 activada, que pudiera estar muy relacionado con la citólisis mediada por contacto detectada en trofozoítos enteros. Sin embargo, en nuestros primeros ensayos no obtuvimos datos cuantitativos de esta actividad.

Un modelo de citólisis para cuantificar actividad citolítica después de tiempos cortos de contacto entre productos amibianos y células en cultivo permitiría intentar la purificación de la citolisina responsable y analizar su importancia en la patogenia de la amibiasis.

El desarrollo de tal modelo ofrecía varios problemas técnicos: 1) la anfotericidad del ácido  $\alpha$  [<sup>14</sup>C] amino isobutírico ([<sup>14</sup>C] AIB), utilizado

como marcador; 2) la opacidad y complejidad bioquímica de la fracción P30, que produce apagamiento de la luminiscencia e inmovilización indeseable del marcador en la superficie de todos los elementos del sistema; 3) la fuerte asociación a membrana de la citolisina. Dichos problemas se resolvieron satisfactoriamente en este trabajo: El modelo desarrollado permite la cuantificación de efectos citolíticos muy finos, producidos por citolisinas asociadas a membrana, en tiempos muy cortos de contacto. También permite hacer el seguimiento de la actividad durante el aislamiento y purificación del factor responsable.

Por los resultados obtenidos, proponemos que la actividad citolítica detectada en extractos de trofozoítos de E. histolytica, corresponde a una citolisina de efectos inmediatos e irreversibles, no descrita hasta ahora; muy probablemente perteneciente al grupo de las citolisinas lábiles al oxígeno y dependientes de grupos -SH.

La rapidez del evento y la asociación de la potencia para liberar el marcador con la virulencia de las cepas, hace pensar que el factor desempeña una importante función en la citólisis mediada por contacto, y por lo tanto, en la virulencia amibiana.

## VII. REFERENCIAS

1. Eldson-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. Guerrant, R.L. 1986 The global problem of amebiasis: Current status, research needs and opportunities for progress. *Reviews of Infectious Diseases* 8:218-227.
4. Gutiérrez, G., Ludlow, A., Espinoza, G., Herrera, S., Muñoz, O., Rattoni, N., Sepúlveda, B. 1976 Encuesta serológica nacional. II Investigación de anticuerpos contra Entamoeba histolytica en la República Mexicana. En B. Sepúlveda y L.S. Diamond (eds) *Memorias de la Primera Conferencia Internacional sobre Amibiasis*, Instituto Mexicano del Seguro Social. México.
5. Brandt, H., Pérez-Tamayo, R. 1970 *Amibiasis* pp. 1-91 La Prensa Médica Mexicana.
6. Kudo, R.R. 1963 *Protozoology* pp. 518-564 Charles C. Thomas Publisher. USA.
7. Griffin, J.L. 1972 Human amebic dysentery. Electron microscopy of Entamoeba histolytica contacting, ingesting and digesting inflammatory cells. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 21:895-906.
8. Ravdin, J.I., Croft, B.Y., Guerrant, R.L. 1980 Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. *Journal of Experimental Medicine* 152:377-390.
9. Ravdin, J.I., Guerrant, R.L. 1982 A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. *Reviews of Infectious Diseases* 4:1185-1207.
10. Mc Laughlin, J., Faubert, G. 1977 Partial purification and some properties of neutral sulfhydryl and an acid proteinase from Entamoeba histolytica. *Canadian Journal of Microbiology* 23:420-425.
11. Muñoz, M.D.L., Calderón, J., Rojkind, M. 1982 The collagenase of Entamoeba histolytica. *Journal of Experimental Medicine* 155:42-51.
12. Gadasí, H., Kessler, E. 1983 Correlation of virulence and collagenolytic activity in Entamoeba histolytica. *Infection and Immunity* 39: 528-531.
13. 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.
14. Magauda, P.L., Pennis, 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.
  15. Long-Krug, S.A., Fischer, K.J., Hysmith, R.M., Ravdin, J.I. 1985 Phospholipase A enzymes of Entamoeba histolytica: description and subcellular localization. The Journal of Infectious Diseases 152: 536-541.
  16. Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Guerrant, R.L., Long-Krug, S.A. 1985 Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of Entamoeba histolytica. The Journal of Infectious Diseases 152:542-549.
  17. Vargas-Villarreal, J. 1985 Caracterización de la principal actividad fosfolipásica de Entamoeba histolytica. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
  18. Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Cantey, J.R., Hofbauer, A.F., Pittman, F.E. 1979 Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from Entamoeba histolytica. The Journal of Infectious Diseases 139: 9-17.
  19. Young, J.A.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.
  20. Mattern, C.F.T., Keister, D.B. 1977 Experimental amebiasis. I Pathogenicity of axenically cultured Entamoeba histolytica in the brain of the newborn mouse. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 26:393-401.
  21. Takeuchi, A., Phillips, P.B. 1975 Electron microscope studies of experimental Entamoeba histolytica infection in the guinea pig. I Penetration of the intestinal epithelium by trophozoites. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 24:34-38.
  22. Chévez, A., Sepúlveda, B., Segura, M., Corona, A., Díaz, J. 1976 Fases iniciales de la actividad patógena de Entamoeba histolytica sobre el cólon y el hígado de hamster. pp. 418-419. En B. Sepúlveda y L.S. Diamond (eds) Memorias de la Primera Conferencia Internacional sobre Amibiasis. Instituto Mexicano del Seguro Social. México.

23. Orozco, E., Guameros, G., Martínez-Palomo, A., Sánchez, T. 1983 Entamoeba histolytica: phagocytosis as a virulence factor. *Journal of Experimental Medicine* 158:1511-1521.
24. 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.
25. Said-Fernández, S., López-Revilla, R. 1982 Subcellular distribution and stability of the major hemolytic activity of Entamoeba histolytica trophozoites. *Zeitschrift fur Parasitenkunde. Parasitology Research* 67:249-254.
26. Said-Fernández, S., López-Revilla, R. 1983 Latency and heterogeneity of Entamoeba histolytica hemolysins. *Zeitschrift fur Parasitenkunde. Parasitology Research* 69:435-438.
27. Prasad, A.K., Das, S.R., Sagar, P. 1982 Haemolysis -a *in vitro* model to investigate tissue necrotic activity of Entamoeba histolytica. *Indian Journal of Experimental Biology* 20:721-725.
28. 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.
29. Gitler, C., Mogyoros, M., Calef, E., Rosenberg, I. 1985 Lethal recognition between Entamoeba histolytica and the host tissues. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 79:581-586.
30. Lynch, E.C., Rosenberg, I.M., Gitler, C. 1982 An ion-channel forming protein produced by Entamoeba histolytica. *The EMBO Journal* 1:801-804.
31. Castro-Garza, J.E. 1984 Análisis de la actividad citolítica de extractos de trofozoítos de Entamoeba histolytica sobre células CHO marcadas con ácido  $\alpha$ - $[^{14}\text{C}]$  amino isobutírico. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
32. Thelestam, M., Mollby, R. 1979 Classification of microbial, plant and animal cytolytins based on their membrane damaging effects on human fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta.* 557:156-169.
33. Rawdin, J.I. 1986 Pathogenesis of disease caused by Entamoeba histolytica: studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytotoxicity. *Reviews of Infectious Diseases* 8:247-260.
34. Diamond, L.S. 1968 Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 and E. histolytica like amebae. *The Journal*

of Parasitology 54:1047-1056.

35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Lowry, O.H., Rosebrough, N.S., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 183:265-275.
39. Said-Fernández, S., López-Revilla, R. 1981 Cytopathogenicity of Entamoeba histolytica: trophozoite homogenates modulate DNA synthesis in a mammalian cell line. *Zeitschrift fur Parasitenkunde. Parasitology Research* 65:11-17.
40. Treviño García Manzo, N., Cruz de Lavin, E. 1980 Estudio secuencial de la invasión de la mucosa del cólon por Entamoeba histolytica. *Archivos de Investigación Médica* 11(Supl 1):199-209.
41. Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J., Sziegoleit, A. 1985 Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infection and Immunity* 47:52-60.
42. Hirsch, J.G., Bernheimer, A.W., Weissmann, G. 1963 Motion picture study of the toxic action of streptolysins on leucocytes. *Journal of Experimental Medicine* 118:223-228.
43. Linder, R., Bernheimer, A.W. 1984 Action of bacterial cytotoxins on normal mammalian cells with altered membrane lipid composition. *Toxicon* 22:641-651.

