

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTOS CITOLITICO DE UNA FOSFOLIPASA A₂, Y
CITOPATICO DE UNA FRACCION VESICULAR DE
Entamoeba histolytica SOBRE HEPATOCITOS
HUMANOS, MEDIADOS POR LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES HUMANOS.

POR

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

RICARDO ZAVALA GONGORA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

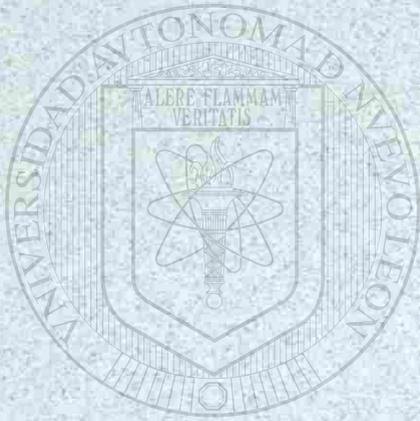
Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología

Junio, 1996





1080072423



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTOS CITOLITICO DE UNA FOSFOLIPASA A₂, Y
CITOPATICO DE UNA FRACCION VESICULAR DE
Entamoeba histolytica SOBRE HEPATOCITOS
HUMANOS, MEDIADOS POR LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES HUMANOS.**

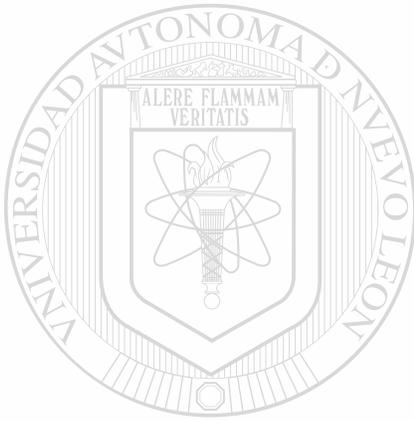
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
POR

RICARDO ZAVALA GONGORA

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología

Junio, 1996





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

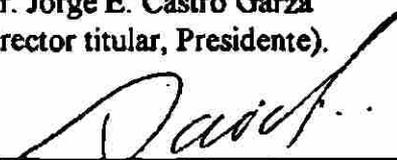


**EFFECTOS CITOLITICO DE UNA FOSFOLIPASA A₂, Y CITOPATICO DE UNA
FRACCION VESICULAR DE *Entamoeba histolytica* SOBRE HEPATOCITOS
HUMANOS, MEDIADOS POR LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES
HUMANOS.**

Aprobación por Comité de Tesis.



Dr. Jorge E. Castro Garza
(Director titular, Presidente).



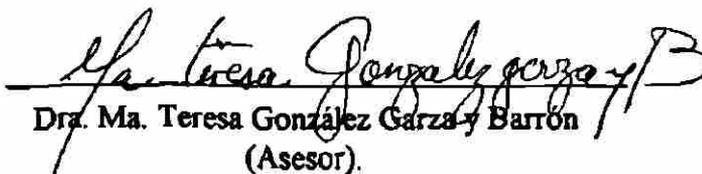
Dr. Salvador Said Fernández
(Director interino, Secretario).



Dr. José Santos García Alvarado
(Coordinador de la especialidad, Vocal).



Dr. Javier Vargas Villarreal
(Asesor).



Dra. Ma. Teresa González Garza y Barrón
(Asesor).

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL
LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR
DEL CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DEL NORESTE:
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL,
BAJO LA ASESORIA DEL DR. JORGE CASTRO GARZA
Y DEL DR. SALVADOR SAID FERNANDEZ.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

Dedico primordialmente esta tesis a quien debo todo lo que soy:

a mi madre:

Sabina Góngora Cerecedo

**A mis Hermanos:
Eduardo y Margarita**

**A mi sobrina:
Saby Laura**

A quien me da su apoyo, confianza y cariño Yolanda Cantú Rentería.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A mi hijo (a) que sin conocerlo aún, ya forma parte importante en mi vida

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mis maestros

A mis familiares

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Graduados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitir realizarme profesionalmente, así mismo, a los maestros que contribuyeron a mi desarrollo profesional.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste:IMSS y a todo el personal que lo compone, por permitir realizar mi trabajo de investigación y por todas las facilidades otorgadas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 83952, otorgada para la realización de este trabajo de investigación. Proyecto de infraestructura F328-M9212, fondos aportados al Dr. Salvador Said Fernández.

Al Dr. Salvador Said Fernández Director del Centro de Investigación Biomédica por la confianza otorgada al aceptarme para realizar mi trabajo de investigación en el laboratorio que acertadamente dirige, por fungir como director interino del trabajo desarrollado y ademas, por honrrarme con su amistad.

Al Dr. Jorge Castro Garza por su paciencia para enseñarme los aspectos básicos de la investigación y por dirigir atinadamente este trabajo de tesis, ademas de honrrarme con su amistad.

Al Dr. José Santos García Alvarado, coordinador de la especialidad en Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por formar parte de mi comisión de tesis, por su ayuda y por su amistad.

A la Dra. Ma. Teresa González Garza y Barrón jefe del laboratorio de Biología Celular y Molecular del CIBIN, por sus atinados consejos y por la ayuda prestada para la realización de esta tesis, además de brindarme su amistad.

Al Dr. Javier Vargas Villarreal por asesorar una parte de este trabajo, por sus recomendaciones y por su amistad.

Al Biólogo Eduardo Campos Góngora por la ayuda prestada dentro y fuera del laboratorio.

A mi familia por el cariño, apoyo y estímulo que siempre me han brindado, particularmente a mi Madre Sra. Sabina Góngora Cerecedo, al matrimonio Hernández-Zavala, a mi sobrina y al matrimonio Campos-González.

De manera muy especial a la Srita. QBP Yolanda Cantú Rentería por compartirme su apoyo, confianza y cariño.

ABREVIATURAS

AGL	Acidos grasos libres
°C	Centigrados
CHO	Línea Celular de Ovario de Hámster Chino
DC ₅₀	Dosis Citolítica Media
DH ₅₀	Dosis Hemolítica Media
EHP	Extracto de Hígado y Páncreas
DO	Densidad óptica
FC	Fosfatidilcolina
g	Gramos
h	Horas
l	Litros
lb/pulg ²	Libras por pulgada cuadrada
LFC	Lisofosfatidilcolina
LPMN	Leucocitos polimorfonucleares humanos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
<hr/>	
M	Molar
MEM	Medio Mínimo Esencial
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
min	Minutos
mOsm/kg	Miliosmoles por Kilogramo
μCi	Microcuries
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μ	Micromolar
N	Normal
ng	Nanogramos
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos

PEHP	Peptona Extracto de Hígado y Páncreas
PEHPS	Medio de Cultivo Axénico de <i>E. histolytica</i>
pH	Potencial de Hidrógeno
PLA₂	Fosfolipasa A₂
PMS	Metosulfato de Fenazina
P30	Fracción Vesicular Amibiana
r²	Coefficiente de Correlación con la recta
rpm	Revoluciones por minuto
SSB	Solución salina balanceada de Hank
TD	Amortiguador de pH Isotónico de Tris
UH	Unidades hemolíticas
X	Concentración con respecto a la solución de trabajo



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

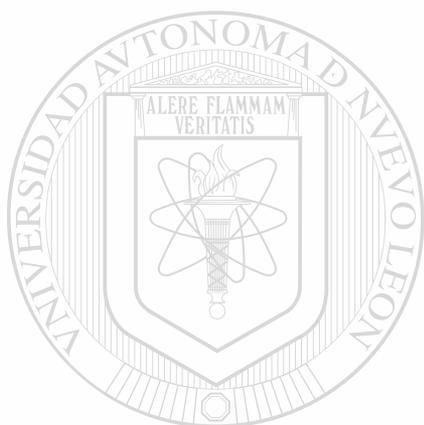
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura	Página
1. Obtención de la fracción vesicular P30 de <i>E. histolytica</i> .	21
2. Purificación de LPMN humanos.	25
3. Modelo colorimétrico para determinar citotoxicidad utilizando MTT.	27
4. Curva de crecimiento de <i>E. histolytica</i> cepa HM1:IMSS.	33
5. Curva de crecimiento de células de Chang.	34
6. Relación temporal de la reducción del MTT por las células de Chang.	35
7. Espectro de absorción de luz del formazán.	36
8. Relación entre la DO_{545} y la concentración de MTT sobre monocapas de células de Chang.	37
9. Relación lineal entre la densidad celular y la reducción del MTT.	38
10. Efecto citolítico de concentraciones variables de tritón X-100 sobre células de Chang.	39
11. Actividad hemolítica de la PLA_2 de veneno de cobra (<i>N. mocambique</i>).	40
12. Actividad citolítica de la PLA_2 de veneno de cobra (<i>N. mocambique</i>).	41
13. Lisis de células de Chang por efecto de la PLA_2 de veneno de cobra (<i>N. mocambique</i>) mediada por LPMN.	43
14. Efecto de concentraciones variables de extractos totales de LPMN humanos sobre células de Chang.	46
15. Actividad hemolítica de la fracción vesicular ambiana P30.	47
16. Efecto citopático de la fracción vesicular P30 de <i>E. histolytica</i> .	48

1. **Potenciación del efecto citolítico de la PLA₂ de veneno de cobra (*N. mocambique*) sobre células de Chang.** 44

2. **Incremento en la capacidad de reducir el MTT de las células de Chang por efecto de la fracción P30.** 49



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

Página

RESUMEN	xv
----------------	-----------

1 INTRODUCCION

1.1 Antecedentes	1
-------------------------	----------

1.1.1 Efectos Citopáticos y/o Citolíticos Producidos	
Directamente por <i>E. histolytica</i>	2

1.1.2 Efectos de Extractos Amibianos Sobre Células en Cultivo	3
--	----------

1.1.3 Efectos Citopáticos y/o Citolíticos Producidos	
Indirectamente por <i>E. histolytica</i> , Mediados por Otros	
Factores u Otras Células en Interacción con las Amibas	5

1.1.4 Leucocitos Polimorfonucleares	6
--	----------

1.1.5 Estudios de la Actividad Citotóxica o Citolítica Amibiana	7
--	----------

1.2 Hipótesis	8
----------------------	----------

1.3 Objetivos	8
----------------------	----------

1.4 Propósito del Trabajo	9
----------------------------------	----------

1.5 Secuencia del trabajo Experimental	9 ®
---	------------

2 MATERIALES

2.1 Origen de los Reactivos	10
------------------------------------	-----------

2.2 Material Biológico	11
-------------------------------	-----------

2.2.1 Cultivos Axénicos de <i>E. histolytica</i> Cepa HM-1:IMSS	11
--	-----------

2.2.2 Hepatocitos Humanos (Células de Chang)	11
---	-----------

2.2.3 Leucocitos Polimorfonucleares Humanos	11
--	-----------

2.3 Preparación de los Medios de Cultivo y Soluciones	12
--	-----------

2.3.1 Medios de Cultivo	12
--------------------------------	-----------

2.3.1.1 MEM Basal	12
--------------------------	-----------

TABLA DE CONTENIDO

	Página
2.3.1.2 Solución de Antibióticos	12
2.3.1.3 Preparación y Almacenamiento del MEM Completo	12
2.4 Obtención del Suero de Bovino y Suero Fetal de Bovino	13
2.5 Preparación del PEHPS	13
2.5.1 EHP	13
2.5.1.1 Preparación y Almacenamiento	13
2.5.2 PEHP	14
2.5.3 PEHPS	14
2.6 Composición y Preparación de las Soluciones	14
2.6.1 Tripsina al 2.5%	14
2.6.2 Tripsina-TD al 0.25%	15
2.6.3 Solución de Rojo de Fenol al 1%	15
2.6.4 TD	15
2.6.5 PBS	15
2.6.6 SSB 1X	16
2.6.7 PLA ₂ de <i>N. mocambique</i>	16
2.6.8 MTT	16
2.6.9 PMS	16
2.6.10 Isopropanol Acidificado	16
2.6.11 Colorante de Wrigth	17
2.6.12 Azul de Tripano	17
2.6.13 Solución de Alsever	17
2.6.14 Polymorphprep®	17

TABLA DE CONTENIDO

Página

3 METODOS

3.1 Tratamiento del Material Para el Cultivo de Amibas	18
3.1.1 Lavado	18
3.1.2 Esterilización	18
3.2 Cultivos Ambianos Axénicos de la Cepa HM-1:IMSS	19
3.2.1 Resiembra y Mantenimiento	19
3.2.2 Curva de Crecimiento	19
3.2.3 Cultivos Masivos	20
3.3 Obtención de Extractos Celulares	20
3.3.1 Cosecha Amibiana y Obtención de P30	20
3.4 Cuantificación de Proteínas	20
3.5 Determinación de la Actividad Fosfolipásica A₂	21
3.5.1 Cromatografía en Placa Fina	21
3.6 Cultivo de Células de Chang	22
3.6.1 Resiembra y Mantenimiento	22
3.6.2 Crioconservación de las Células de Chang	23
3.6.3 Descongelamiento de las Células de Chang	23
3.6.4 Limpieza de la Incubadora de CO ₂	23
3.6.5 Curva de Crecimiento	24
3.7 Recolección y Purificación de LPMN Humanos	24
3.7.1 Preparación de las Muestras de Sangre	24
3.7.2 Preparación del Gradiente de Polimorphprep	24
3.7.3 Separación de los LPMN	24
3.7.4 Recuperación de los LPMN	25
3.7.5 Lavado de los LPMN	25

TABLA DE CONTENIDO

	Página
3.7.6 Lisis de los Eritrocitos	26
3.7.7 Tinción de los LPMN	26
3.8 Modelo colorimétrico para determinar citotoxicidad utilizando MTT	26
3.8.1 Siembra de las Células de Chang en la Microplaca	26
3.8.2 Ensayo Colorimétrico	27
3.8.3 Determinación del Tiempo Optimo de Reducción del MTT	28
3.8.4 Espectro de Absorción del Formazán	28
3.8.5 Determinación de la concentración óptima del MTT en nuestro modelo.	28
3.8.6 Relación Entre la Densidad Celular y la Reducción del MTT	28
3.8.7 Determinación de la DC ₅₀ del Tritón X-100 Sobre Células de Chang.	29
3.9 Determinación de la DH ₅₀ de la PLA ₂ de <i>N. mocambique</i> y de P30	29
3.10 Determinación de la DC ₅₀ de la PLA ₂ de <i>N. mocambique</i>	30
3.11 Efecto de Concentraciones Variables de Extractos Totales de LPMN Humanos Sobre Células de Chang en Cultivo	30
3.12 Lisis de Células de Chang por Efecto de la PLA ₂ de <i>N. mocambique</i> Mediada por LPMN Humanos	31
3.13 Efecto de la Fraccion Vesicular Amibiana P30 Sobre Celulas de Chang Mediado por LPMN Humanos.	31
4 RESULTADOS	
4.1 Curva de Crecimiento de <i>E. histolytica</i> Cepa HM1:IMSS	32
4.2 Curva de Crecimiento de Células de Chang	34
4.3 Estandarización de un Modelo Para Determinar el Efecto de la PLA ₂ y de la P30 Sobre Células de Chang	35

TABLA DE CONTENIDO

Página

4.3.1	Relación Temporal de la Reducción del MTT por las Células de Chang	35
4.3.2	Longitud de Máxima Absorbancia del MTT	36
4.3.3	Relación Entre Desarrollo de Color y la Concentración de MTT en Células de Chang	37
4.3.4	Relación Lineal Entre la Densidad Celular y la Reducción del MTT	38
4.4	Efecto Citolítico de Concentraciones Variables de Tritón X-100 Sobre Células de Chang	39
4.5	Actividad Hemolítica de la PLA ₂ de Veneno de Cobra (<i>N. mocambique</i>)	40
4.6	Actividad Citolítica de la PLA ₂ de Veneno de Cobra (<i>N. mocambique</i>)	41
4.7	Lisis de Células de Chang por Efecto de la PLA ₂ de Veneno de Cobra (<i>N. mocambique</i>), Mediada por LPMN	42
4.8	Efecto de Concentraciones Variables de Extractos Totales de LPMN Sobre Células de Chang	45
4.9	Actividad Hemolítica de P30	47
4.10	Efecto Citopático de P30 de <i>E. histolytica</i>	48
<hr/>		
5	DISCUSION	
5.1	Discusión	50
5.2	Conclusiones	56
5.3	Perspectivas	57
6	REFERENCIAS	58

RESUMEN

Ricardo Zavala Góngora

Fecha de graduación: Junio, 1996.

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Título del estudio: **EFFECTOS CITOLITICO DE UNA FOSFOLIPASA A₂, Y CITOPATICO DE UNA FRACCION VESICULAR DE *Entamoeba histolytica* SOBRE HEPATOCITOS HUMANOS, MEDIADOS POR LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS.**

Area de estudio: Microbiología Médica

El mecanismo patogénico de la amibiasis aún no se entiende cabalmente, en parte porque no se conoce la importancia relativa que tiene cada uno de los factores implicados en el proceso de destrucción de tejidos, especialmente la de cada una de las moléculas amibianas descritas hasta ahora como citolisinas.

El absceso hepático amibiano consiste en áreas masivas de necrosis, compuestas de material granular, eosinofílico y necrótico, con restos nucleares, pocos leucocitos o amibas o ninguno de éstos. Se ha postulado que el proceso de destrucción tisular en el absceso hepático amibiano no se debe exclusivamente al parásito, sino que las amibas, lisan a los LPMN y macrófagos que acuden a combatir la infección; y que estas células liberan sus enzimas hidrolíticas, que a su vez destruyen a las células del hígado.

Entre las citolisinas amibianas descritas hasta ahora se encuentra una PLA₂ dependiente de calcio.

Se ha visto que en la fracción vesicular amibiana denominada P30, reside la mayor parte de las actividades hemolítica y citolítica de los trofozoítos de *E. histolytica*. Las fosfolipasas A₂ residen en su mayor parte en la misma fracción y por lo tanto podría ser el factor o uno de los factores citolíticos responsables de la destrucción inicial de los LPMN y macrófagos y de la subsecuente destrucción de los hepatocitos en el absceso hepático amibiano. Una de estas PLA₂ con efecto citolítico directo fue purificada a

homogeneidad, pero con rendimientos muy bajos. En base a estos antecedentes planteamos la hipótesis de que la inducción y liberación de productos de leucocitos PMN por la acción de una PLA₂ son capaces de lisar *in vitro* hepatocitos humanos y, dado que P30 contiene la mayor actividad hemolítica y de fosfolipasa A₂ de los trofozoitos de *E. histolytica*, esta fracción es capaz de potenciar su acción induciendo la liberación de productos citolíticos de LPMN humanos.

Para poner a prueba nuestra hipótesis nos planteamos 3 objetivos principales que fueron: (I) Instrumentar un método de uso generalizado para analizar el efecto de preparaciones citolíticas en nuestro modelo experimental. (II) Analizar el efecto citolítico de LPMN humanos preincubados con fosfolipasa A₂ de veneno de cobra (*Naja mocambique*) sobre hepatocitos humanos (células de Chang). (III) Analizar el efecto de LPMN preincubados con la fracción vesicular P30 sobre células de Chang.

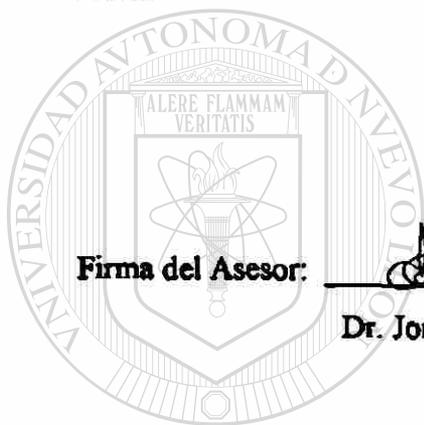
Logramos instrumentar un modelo colorimétrico de uso generalizado para poder evaluar el efecto de nuestras preparaciones de ensayo. Con el método de citólisis debidamente instrumentado, encontramos que la PLA₂ de veneno de cobra (a) lisó a las células de Chang en función de la dosis (de 0 a 21 ng), (b) cuando preincubamos por 6 h las mismas dosis de PLA₂ con un número constante de 100 LPMN/ célula, se indujo una lisis directamente proporcional a la dosis de PLA₂, pero con una pendiente mayor que la producida por la PLA₂ sola. Con 21 ng de fosfolipasa el efecto citolítico por LPMN fue 1.66 veces mayor que por el efecto directo de la fosfolipasa (c) cuando preincubamos eritrocitos humanos en un número equivalente en superficie de membrana a aquél que proporciona el número de LPMN usado en el experimento anterior y con las mismas dosis de fosfolipasa observamos un efecto citolítico menor. Estos resultados confirmaron nuestra primera hipótesis.

En base a esto y considerando que en la fracción P30 reside la mayor actividad hemolítica y de PLA₂ de *E. histolytica* probamos esta fracción amibiana utilizando las mismas condiciones y número de LPMN y encontramos que, en contra de lo que esperábamos, cantidades variables de P30 (de 0 a 50 mg de proteínas totales, con 0-100 UH) mostraron los siguientes efectos: (a) La fracción P30 indujo un notable incremento de la capacidad que tienen las células de Chang para reducir el MT \bar{T} ; (b) Al preincubar la

fracción P30 con LPMN la capacidad reductora de las células de Chang se incrementó 21 veces aproximadamente.

(c) La fracción sola redujo el MTT en función de la dosis.

En base a nuestros resultados, concluimos que (1) La PLA₂ induce a los LPMN a producir y/o liberar moléculas citolíticas que aumentan el efecto de la PLA₂. (2) La fracción P30 induce un notable incremento de la capacidad reductora de las células de Chang. Este efecto es aparentemente mayor cuando es mediado por LPMN humanos y utilizando altas concentraciones de P30. (3) Que a diferencia de lo que se ha reportado en otras células, P30, una fracción subcelular de amibas conserva la capacidad de reducir el MTT.



Firma del Asesor:

Dr. Jorge Castro Garza

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

La amibiasis es una enfermedad parasitaria que afecta al 10% de la población mundial. Es causada por el protozooario *Entamoeba histolytica* y es importante por su morbilidad y por su mortalidad (1, 2). En la última década se ha visto una reducción significativa en la morbilidad y mortalidad de la amibiasis. Lo que pudiera deberse a una mayor y mejor disponibilidad, accesibilidad y utilización de los servicios médicos, permitiendo la temprana y oportuna identificación de casos de amibiasis invasora (la que habitualmente responde rápidamente al tratamiento). Además la mayor disponibilidad de antiambianos, principalmente metronidazol, puede también explicar la disminución de la incidencia de la amibiasis invasora y los porcentajes de fatalidad de la enfermedad (3). A pesar de esto, la letalidad continúa elevada en áreas rurales de México (10.3%) y en las series de la bibliografía anglosajona citan de un 28.6 a 66.6% (4).

La infección por *E. histolytica* tiene lugar cuando se ingieren los quistes del parásito (forma infectiva, no mótil) los cuales al llegar al intestino liberan a los trofozoítos (forma invasiva, mótil), estos pueden vivir como comensales en la luz del intestino o bien atravesar las paredes y llegar vía porta al hígado y luego diseminarse a otros órganos (5, 6). Cuando este parásito invade el hígado, produce el absceso hepático amibiano que es la causa principal de muerte en enfermos con amibiasis.

El absceso hepático amibiano consiste en áreas masivas de necrosis, compuestas de material granular, eosinofílico y necrótico, con restos nucleares, pocos leucocitos o amibas o ninguno de éstos en el centro de la lesión.

El mecanismo patogénico de *E. histolytica* es un proceso multifactorial (7, 8) y al igual que en todos los microorganismos patogénicos, la virulencia depende de dos aspectos característicos de cada organismo: a) su invasividad o capacidad para

multiplicarse y causar destrucción tisular localizada y b) su toxigenicidad o capacidad para producir y excretar sustancias que pueden causar lesiones distantes (c. ref. 9). Entre las actividades biológicas amibianas que se consideran importantes en la producción de lesiones están la adherencia a células blanco (10-13), la citólisis (14, 15), la fagocitosis (16), la hidrólisis del moco que recubre y protege al intestino (17-19), la disolución del cemento celular y de la colágena (20-23), así como la acción de otras enzimas no específicas (24-27) y actividades tóxicas (28, 29). Para su estudio se han utilizado trofozoítos enteros y extractos amibianos en modelos animales experimentales y diversas líneas celulares en cultivo. Además una buena cantidad de información ha sido obtenida a partir de observaciones en tejidos humanos o de animales de laboratorio infectados con amibas (30).

Las lesiones amibianas pueden ser producidas por un efecto directo o indirecto de los trofozoítos. Como efecto directo de los trofozoítos, se ha demostrado (*in vitro*) la citólisis y la fagocitosis sobre células animales en cultivo y leucocitos. Este efecto puede constituir una porción importante del mecanismo patogénico de la amiba. El daño indirecto se ha inferido de estudios de biopsias humanas e infecciones en modelos experimentales en animales (c.ref. 9, 31).

1.1.1. Efectos Citopáticos y/o Citolíticos Producidos Directamente por *E. histolytica*

Trofozoítos de la cepa HM1 de *E. histolytica* provocaron la casi total destrucción de cultivos de células MDCK, estos resultados mostraron que la magnitud del efecto citopático producido por las diferentes cepas amibianas esta en relación directa con el grado de virulencia mostrado por las cepas *in vitro* (32).

Utilizando monocapas epiteliales de células MDCK en cultivo se encontró que el mecanismo agresivo de los trofozoítos de *E. histolytica* es un fenómeno complejo multifactorial que incluye: a) daño de la membrana plasmática de las células efectoras por

contacto y desplazamiento; b) fagocitosis de células epiteliales lisadas o aparentemente intactas pero desprendidas, y c) degradación intracelular de las células ingeridas (33).

Trofozoitos de cepas virulentas de *E. histolytica* cultivados axenicamente fueron citopáticos para una variedad de células de mamífero *in vitro* (34, 35). Se han descrito 3 efectos: desprendimiento y redondeamiento de monocapas celulares con preservación de la viabilidad celular (efecto citopático) (19); muerte celular y fagocitosis (efecto citotóxico) (14); y desintegración celular (efecto citolítico) (36).

Mientras el efecto citotóxico claramente es dependiente de contacto (37); el efecto citopático y citolítico parecen ser independientes de contacto (38).

1.1.2 Efectos de Extractos Amibianos Sobre Células en Cultivo

Dosis variables de extractos totales de trofozoitos causaron inhibición de la incorporación de [³H]-timidina al DNA nuclear en células de la línea CHO. La inhibición de la incorporación dependió de la dosis del extracto (9).

En extractos libres de trofozoitos se ha detectado y caracterizado actividad hemolítica (31) y citolítica (39, 40) sobre células en cultivo. Los extractos amibianos presentan actividad hemolítica dependiente de la dosis y ésta es constante, reproducible y específica de los extractos amibianos. Cada cepa amibiana tiene un perfil hemolítico característico, *E. histolytica* tiene una actividad hemolítica más potente que la de otras especies (9).

Vargas-Villarreal y Said Fernández (39) observaron una destrucción completa de las células CHO premarcadas, que coincidió con la liberación total de [³H] UTP, lo cual indicó que al menos uno de los factores citolíticos de la fracción amibiana vesicular P30 pertenece al grupo 1 de la clasificación de Thelestam y Möllby (41), es decir, una citolisina correspondiente al tipo de los agentes que producen daños extensos en la membrana plasmática, lo cual coincidió con lo observado en eritrocitos con los mismos extractos amibianos.

Desde hace algunos años se ha propuesto a las fosfolipasas del tipo A como posibles factores patogénicos de *E. histolytica*. Interacciones *in vitro*, tanto de trofozoitos enteros como de extractos amibianos con células susceptibles de mamífero mostraron que la actividad citolítica amibiana parece deberse a una fosfolipasa A (15, 42-44), y a otros factores como la amebaporo (45, 46) proteasas (47, 48), hemolisinas (49) y a un factor de efecto inmediato dependiente del potencial de óxido-reducción (40).

McCaul y col. (44) observaron con trofozoitos enteros de *E. histolytica* y células de Chang premarcadas con [^{51}Cr], que la radioactividad liberada disminuyó en un 50% por el efecto de un inhibidor (inhibidor de Rosenthal) específico para fosfolipasas del tipo A (50).

Nuestro grupo de investigación observó que la fracción P30 proveniente de extractos de trofozoitos cultivados axénicamente de *E. histolytica*, tiene 2 tipos de actividad fosfolipásica, una A₁ y una A₂ además de una lisofosfolipasa L₁. La actividad se debe al efecto de 2 fosfolipasas: una cuya actividad máxima se detecta a pH 3.5 y no requiere Ca⁺⁺ y la otra que sí lo requiere y cuya actividad máxima es a pH 8.0 (51). Long-Krug y col. (42), utilizando extractos sonicados de cultivos axénicos de *E. histolytica*, encontraron 2 actividades de fosfolipasas A₂: una independiente de Ca⁺⁺ a pH ácido y asociada a la fracción soluble de dichos extractos y otra fuertemente asociada a la superficie de la membrana plasmática de las amibas, que es dependiente de Ca⁺⁺ y cuya actividad máxima se observa a pH 8.0. De acuerdo con estos resultados se propuso a la fosfolipasa A₂ dependiente de Ca⁺⁺ como uno de los factores citolíticos implicados en el mecanismo patogénico de la amibiasis (42).

La actividad fosfolipásica se encuentra principalmente en la fracción P30 que contiene la mayor actividad hemolítica (52, 53). Por ésto, la hemólisis y la citólisis podrían deberse a los mismos factores: una fosfolipasa A₂ y sus productos de hidrólisis. La actividad citolítica de los extractos amibianos descrita podría tener su contraparte en la amibiasis y desempeñar una función importante en la virulencia de *E. histolytica*.

1.1.3 Efectos Citopáticos y/o Citolíticos Producidos Indirectamente por *E. histolytica* Mediados por otros Factores u otras Células en Interacción con las Amibas

En experimentos *in vitro* las amibas o sus extractos causan la muerte de células en cultivo recién aisladas de hígado de rata o hámster o de líneas celulares (54, 55). Sin embargo, hasta ahora no se han observado daños producidos directamente por trofozoitos de *E. histolytica* a las células hepáticas de animales infectados experimentalmente por vía intrahepática (56). Por ello se ha sugerido un mecanismo citolítico, mediado por leucocitos.

Cuando se inoculan amibas intraportalmente en hámsters, los estados tempranos de la lesión se caracterizan por infiltración celular aguda, observándose un aumento en el número de LPMN, los cuales rodean a los trofozoitos. Los histiocitos y leucocitos lisados se encuentran en la periferia de las lesiones. Los hepatocitos cercanos a las lesiones muestran cambios degenerativos que llevan a la necrosis. En estados avanzados la extensión de la necrosis se incrementa, los macrófagos y células epiteloideas reemplazan a la mayoría de los leucocitos y se desarrollan granulomas bien organizados (56).

En el modelo experimental donde se inoculan amibas directamente al hígado del gérbil (57, 58), las fases tempranas de las lesiones hepáticas amibianas estuvieron caracterizadas por una respuesta inflamatoria aguda la cual progresó rápidamente a ser granulomatosa 5 días después de la inoculación. Los LPMN fueron las células predominantes al inicio de la lesión, y más tarde los macrófagos e histiocitos rodearon la cavidad de la lesión en una corona fibrinosa. En humanos las lesiones tempranas también están caracterizadas por una área necrótica, la ausencia de fibrosis, y un infiltrado de LPMN (59). En el gérbil, la necrosis de células hepáticas, combinada con los productos líticos secretorios de las células inflamatorias, probablemente agravan el proceso necrótico hasta que la fibrosis ocurre. Es probable que la respuesta granulomatosa ocurra como un resultado de la ineficiencia de la respuesta inflamatoria aguda para secuestrar y destruir a los trofozoitos (58); mientras que los trofozoitos sí son capaces de lisar a los LPMN (60, 61).

Tsutsumi V. y col. (56, 62) y Chadee K. y col. (57, 58) han puesto de manifiesto la ausencia de un contacto directo entre las amibas y las células del parénquima del hígado durante los estadios iniciales de la necrosis hepática focal inducida por el parásito. Por otro lado, diversos investigadores han mostrado en modelos *in vitro* que la muerte de las células blanco se produce solo cuando hay de por medio un contacto directo entre ellas y las amibas. Lo anterior sugirió que en el absceso hepático amibiano la citólisis de los hepatocitos no es producida directamente por las amibas, sino que es el resultado de la acumulación y la subsecuente lisis de leucocitos y macrófagos que rodean a los trofozoitos (56, 62).

Salata y Ravdin, encontraron que *E. histolytica* destruye monocapas de células hepáticas humanas de Chang o de la línea CHO y que la presencia de LPMN aumenta la destrucción de estas monocapas celulares. Cuando añaden catalasa la destrucción no disminuye. Este estudio establece que *in vitro*, la lisis de neutrófilos humanos por *E. histolytica* aumenta la destrucción de células hepáticas y que este efecto no se debe a la liberación de productos oxidativos de los neutrófilos. De acuerdo con este análisis, los LPMN intervienen en el proceso de daño tisular en el absceso hepático amibiano como células efectoras favoreciendo el daño tisular mas que ayudar a la resolución de la infección (55).

1.1.4 Leucocitos Polimorfonucleares

Los leucocitos polimorfonucleares o granulocitos son células del sistema inmune celular que comprenden aproximadamente el 60% de los leucocitos circulantes en el humano. El neutrófilo maduro es primordialmente una célula fagocitaria con 2 tipos diferentes de gránulos. Estos gránulos se conocen como primarios o azurófilos que contienen hidrolasas ácidas, mieloperoxidasa, numerosas proteínas catiónicas con actividad antibacteriana y lisozima; y los gránulos secundarios o específicos que contienen lactoferrina y algo de lisozima. No se sabe la localización subcelular de la fosfatasa alcalina. En el neutrófilo maduro, 80-90% de los gránulos son específicos y 10-20% son

azurófilos. Los neutrófilos tienen una vida media aproximada de 6-20 h en la sangre periférica y su supervivencia en los tejidos, en condiciones de equilibrio estacionario, es hasta de 5 días. Los granulocitos son producidos a razón de 1.6×10^9 cel/kg/día. Son capaces de emigrar hacia los estímulos en presencia de numerosos factores quimiotácticos, incluyendo productos bacterianos, proteasas de los tejidos y componentes del complemento. Una vez localizado en las zonas inflamatorias, el neutrófilo es capaz de fijar e ingerir materiales apropiadamente opsonizados. Los neutrófilos tienen receptores de membrana para C3 y para la porción Fc de las inmunoglobulinas. Después de la fagocitosis, aparece una secuencia compleja de eventos morfológicos y bioquímicos. Los principales fenómenos bioquímicos concomitantes a la fagocitosis, incluyen aumento en el metabolismo de los fosfolípidos, marcada estimulación de la derivación hexosamonofosfato y generación de peróxido de hidrógeno. Diversos factores afectan la liberación de las enzimas lisosómicas que producen el daño histico. La fagocitosis no necesita ocurrir antes de que las enzimas lisosómicas sean liberadas. En sí, los LPMN son células altamente capacitadas para destruir células invasoras ya que cuentan con variados mecanismos para ello (63).

1.1.5 Estudio de la Actividad Citolítica o Citotóxica

Como hemos visto *E. histolytica* posee diferentes moléculas y mecanismos para causar daño celular y tisular durante su invasión, entre los que se cuentan las citolisinas. Para el estudio del efecto de estos factores es necesario contar con modelos *in vitro* que nos permitan analizar su actividad en forma precisa. Los métodos mas recientes se basan en la determinación de la actividad *in situ* de algunas enzimas como indicadores de viabilidad celular. Estos son los principios en los que se basa el modelo del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio) descrito por Mosman (64). Este modelo se basa en la reducción de una sal de tetrazolio (MTT), el anillo de tetrazolio del MTT es roto por el sistema de la tetrazolio succinato-reductasa (EC 1.3.99.1) el cual pertenece a la cadena respiratoria de la mitocondria y está activo solamente en células vivas (65). Esto lleva a la producción de cristales de formazán insolubles en agua. El

formazán produce una coloración púrpura cuando se disuelve con isopropanol acidificado, esta coloración es cuantificable espectrofotométricamente a 545-570 nm y está en relación directa con el número de células vivas. De tal manera que una disminución en el número de células vivas por efecto de un agente dado se refleja en una disminución de la absorbancia. Este modelo es ampliamente utilizado para medir citotoxicidad, proliferación o activación y viabilidad celular (66, 67).

Considerando lo antes expuesto postulamos las siguientes hipótesis:

1.2 Hipótesis

- a) La acción de una PLA₂ sobre LPMN humanos induce la liberación de productos celulares que son capaces de lisar *in vitro* hepatocitos humanos.
- b) Dado que P30 contiene la mayor actividad hemolítica, citolítica y de PLA₂ en los trofozoítos de *E. histolytica*, esta fracción es capaz de inducir la producción y/o liberación de productos citopáticos de LPMN humanos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.3 Objetivos

- a) Instrumentar un método de uso generalizado para analizar el efecto citolítico de nuestras preparaciones en un modelo experimental.
- b) Analizar el efecto citolítico de LPMN humanos preincubados con PLA₂ de veneno de cobra (*N. mocambique*) sobre células de Chang.
- c) Analizar el efecto de LPMN preincubados con P30 sobre células de Chang.

1.4 Propósito del Trabajo

El mecanismo patogénico de la amibiasis es un proceso multifactorial. De tal modo, no se conoce la importancia que tiene cada una de las moléculas implicadas hasta ahora. El propósito de este trabajo consistió en implementar un modelo *in vitro* que nos permitiera analizar el efecto citoletal de P30 (rica en PLA₂), en una línea celular de hepatocitos humanos; además de investigar si este efecto se potencia al poner de por medio LPMN humanos en este modelo. En este trabajo también analizamos el efecto que tiene una PLA₂ pura en el mismo sistema.

Los resultados del presente trabajo nos permitieron analizar el papel que desempeñan las PLA₂ y P30 sobre hepatocitos humanos mediado por LPMN.

1.5 Secuencia del Trabajo Experimental

Para cumplir con nuestros objetivos dividimos el trabajo en 3 etapas:

- ◆ La primera consistió en implementar las técnicas necesarias: 1) Un modelo para determinar el efecto citoletal sobre células de Chang, 2) Una técnica para purificar LPMN humanos y 3) Una técnica para obtener la P30.
- ◆ En la segunda etapa determinamos el efecto citoletal de la PLA₂ de *N. mocambique* sobre hepatocitos en cultivo y como se modifica este efecto en la presencia de LPMN.
- ◆ La tercera etapa consistió en determinar el efecto citopático de P30 sobre hepatocitos en cultivo, y como es modificado este efecto con la presencia de LPMN.

2. MATERIALES

2.1 Origen de los Reactivos

1. De **Sigma Chemical Company** (Saint Louis, Missouri, USA): ácido ascórbico, azida de sodio, azul de tripano, L-cisteína, dodecilsulfato de sodio, glucosa (dextrosa), seroalbúmina bovina (fracción V), reactivo de Folin Ciocalteau, trizma base, trizma-HCl, fosfolipasa A₂ de *Naja mocambique*, MTT, PMS.

2. De **Merck** (Alemania): rojo de fenol, 2,5 difeniloxazol (PPO); de Merck de México: cloruro de sodio, sulfato de magnesio, tolueno.

3. De **Reactivos Monterrey**: hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, ácido clorhídrico, cloruro de calcio.

4. De **Bioxón de México**: peptona de caseína.

5. De **Mallinck RODT Chemical Works**: citrato trisódico.

6. De **J.T. Baker** (México): alcohol etílico absoluto, bicarbonato de sodio.

7. De **Técnica química** (México): cloruro de potasio.

8. De **Lakeside S.A.** (México): penicilina, sulfato de estreptomina.

9. De **GIBCO Laboratories** (Grand Island, N.Y., USA): medio MEM, polymorphprep®

10. De **Difco Laboratories** (Detroit, Michigan, USA): tripsina.

11. El extracto de hígado y páncreas, el suero de bovino y el suero fetal de bovino fueron procesados en el laboratorio de la División de Biología Celular y Molecular (CIBIN:IMSS).

2.2 Material Biológico

2.2.1 Cultivo Axénico de *Entamoeba histolytica* Cepa HM-1:IMSS

La cepa HM-1:IMSS, abreviada en el texto como HM1, ha sido mantenida en cultivo bajo condiciones axénicas en nuestro laboratorio desde hace más de 16 años.

2.2.2 Hepatocitos Humanos (Células de Chang)

Utilizamos la línea de células hepáticas de Chang (ATCC CCL 13) establecida por Chang, R.S. en 1954 a partir de tejido hepático humano no maligno (68), la cual fue gentilmente donada por la Dra. L. Martínez del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UANL.

2.2.3 Leucocitos Polimorfonucleares Humanos (LPMN)

Obtuvimos los LPMN a partir de sangre periférica humana (69-71). La sangre fue procesada dentro de dos horas luego de haber sido colectada. Separamos los LPMN como se describe más adelante en métodos.

2.3 Preparación de los Medios de Cultivo y Soluciones

Indicamos las concentraciones de los medios de cultivo y soluciones madre con un número seguido de una X que representa su concentración respecto a la solución de trabajo o solución 1X. Preparamos las soluciones con agua desionizada (4.0 Megaohms, desionizador Sybron/Barstead Co. Div. de Sybron Corporation, Boston, MA, USA.).

2.3.1 Medios de Cultivo

2.3.1.1 Preparación del MEM Basal

Disolvimos el contenido de un sobre (12 g) con 800 ml de agua desionizada, añadimos 2.2 g de NaHCO₃. Ajustamos el pH a 6.7, añadimos 10 ml de la solución de antibióticos 100 X y aforamos a 1 l. Esterilizamos por filtración a través de membranas de nitrocelulosa HAWP, poros de 0.22 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Distribuimos en alíquotas de 85 ml en botellas estériles de borosilicato con tapón de rosca. Guardamos a 4°C hasta su uso.

2.3.1.2 Solución 100 X de Antibióticos (Penicilina-Estreptomicina)

Penicilina G-sódica 200,000 U.I. y sulfato de estreptomicina 0.5 g. Disolvimos los componentes en 100 ml de agua desionizada y esterilizamos la solución por filtración. La almacenamos a -20°C en alíquotas de 10 ml en tubos estériles con tapón de rosca de 16 x 100 mm, Pyrex.

2.3.1.3 Preparación y Almacenamiento del Medio MEM Completo

En condiciones asepticas, agregamos 15 ml de suero fetal bovino esterilizado por filtración a cada frasco conteniendo 85 ml de medio MEM basal (solución de trabajo 1 X) y los guardamos a 4°C hasta su uso.

2.4 Obtención del Suero Bovino y Suero Fetal de Bovino

Obtuvimos el suero a partir de la sangre que colectamos en el rastro municipal en probetas de plástico de 2 l. Incubamos la sangre por 6 h a 36°C y separamos el coágulo de las paredes de la probeta con una varilla de vidrio. Refrigeramos toda la noche, recuperamos el suero centrifugando a 3,000 rpm/30 min y lo guardamos a -20°C en botellas de 1 l.

Descongelamos el suero y lo filtramos por una serie de membranas con tamaño de poro desde 10 hasta 0.22 µm, utilizando presión positiva de N₂ antes de esterilizarlo en condiciones asépticas a través de membranas HAWP con poros de 0.22 µm. Distribuimos el suero en alíquotas de 100 ml en botellas estériles de borosilicato con tapón de rosca.

Para descomplementar el suero, lo calentamos durante 30 min a 56°C, lo enfiamos a temperatura ambiente y lo almacenamos a -20°C hasta su uso.

2.5 Preparación del Medio de Cultivo PEHPS

2.5.1 EHP (72).

2.5.1.1 Preparación y almacenamiento. Para cada lote de EHP utilizamos 350 g de páncreas de bovino, 350 g de páncreas de cerdo y 1000 g de hígado de bovino; los limpiamos de tejido conectivo y los lavamos con NaCl al 0.85%; los cortamos en trozos pequeños y los molimos con un molino de carne eléctrico (Tor-Rey, Monterrey, N.L.); el producto lo licuamos y mezclamos con 1.354 volúmenes de PBS, pH 8.0 precalentado a 56°C. Para ajustar el pH agregamos 10 ml de NaOH 10 N por cada 2,800 ml del licuado y lo incubamos durante 4 h a 37°C. Esta mezcla la colocamos en un vaso de precipitado de 4 l de capacidad, de polipropileno (Nalgene Labware Division, N.Y., USA) y la calentamos en autoclave a 121°C por 15 min. Inmediatamente después retiramos el sobrenadante con un colador y filtramos a través de ocho gasas superpuestas. Mezclamos el producto con tierra de diatomeas (250 ml de tierra blanca, Hiflo Estándar/l de extracto) y lo filtramos pasándolo a través de un colchón de 400 ml de tierra de diatomeas (Estándar Super Cell) sobre matraz Kitasato de 4 l). Preparamos el colchón suspendiendo

200 ml de tierra en agua desionizada, aforando a 1 l. Pasamos la mezcla a través de un filtro Whatman # 1 (Whatman, Laboratory Division; Springfield Mill, Maidstone Kent., England), colocado sobre un embudo Buchner, dejando la tierra compacta pero evitando que se formaran grietas. El producto final lo almacenamos a -20°C hasta el momento de usarlo.

2.5.2 PEHP

Para su preparación disolvimos peptona de caseína (10 g); glucosa (6 g); L-cisteína (1 g); ácido ascórbico (0.2 g); KH_2PO_4 (0.6 ml) y K_2HPO_4 (1 g) en 500 ml de agua desionizada. Descongelamos el extracto de hígado y páncreas y lo filtramos por papel Whatman No. 1. Tomamos 250 ml y los agregamos a los demás componentes, ajustamos el pH a 7.0, aforamos a 1 l y distribuimos 10 ml de medio en tubos de cultivo de borosilicato de 16 x 125 mm con tapón de rosca (Pyrex o Kimax), o 350 ml en frascos para cultivo en suspensión de 500 ml ("spinners", Bellco Glass Inc. Vineland, NJ, USA). Esterilizamos por autoclave a 15 lb/pulg²/15 min. Almacenamos a temperatura ambiente.

2.5.3 PEHPS

Añadimos asepticamente a los tubos con 10 ml de medio basal PEHP, 1 ml de suero de bovino descomplementado o 35 ml a los "spinners" con 350 ml del medio.

2.6 Composición y Preparación de las Soluciones

2.6.1 Solución de Tripsina al 2.5%

Disolvimos 2.5 g de tripsina en 100 ml de agua desionizada mediante agitación lenta a 4°C toda la noche. Filtramos en papel Whatman No.1. Esterilizamos por filtración ($0.22\ \mu\text{m}$) y guardamos a -20°C en aliquotas de 10 ml.

2.6.2 Tripsina-TD 0.25% (1 X)

Mezclamos 5 ml de la solución de tripsina al 2.5%, 0.3 ml de rojo de fenol al 1%, 0.5 ml de la solución de estreptomicina-penicilina (100 X) y aforamos a 50 ml con salino TD 1 X. Esterilizamos por filtración y distribuimos en aliquotas de 6 ml en tubos de borosilicato de 13 x 100 mm con tapón de rosca estériles. Almacenamos a -20°C.

2.6.3 Solución de Rojo de Fenol al 1%

Disolvimos 1 g de rojo de fenol en 6 ml de NaOH 1 N y aforamos a 100 ml con agua desionizada. Filtramos por papel Whattman No.1 y almacenamos a -20°C.

2.6.4 Salino TD 1 X

Disolvimos NaCl (8 g), Na₂HPO₄ (0.1 g), KCl (3.75 g) y Trizma base (3 g) en 700 ml de agua desionizada. Añadimos 15 ml de HCl 1 N y agitamos hasta que la solución adquirió la temperatura ambiente (15 min). Ajustamos el pH a 7.4 con HCl 1 N y aforamos a 1 l con agua desionizada. Distribuimos en frascos de vidrio cada 100 ml y esterilizamos por autoclave a 15 lb/pulg²/15 min. Almacenamos a temperatura ambiente.

2.6.5 PBS

Disolvimos NaCl (6.5 g), K₂HPO₄ (2.8 g) y KH₂PO₄ (0.4 g) en 1 l de agua desionizada y ajustamos el pH a 7.5 con NaOH 10 N. Distribuimos la solución en frascos de borosilicato de 100 ml y esterilizamos por autoclave a 15 lb/pulg² durante 15 min. Almacenamos a 4°C.

2.6.6 SSB 1 X

Pesamos CaCl_2 (0.07 g), glucosa (1 g), NaCl (7.2 g), KCl (0.4 g), MgSO_4 (0.2 g), y Trizma base (0.12 g). Estos ingredientes los disolvimos en 800 ml de agua desionizada y ajustamos el pH a 7.0 con HCl 5 N. Aforamos a 1 l y ajustamos la osmolaridad a 300 ± 10 mOsm/Kg con NaCl . Esterilizamos por filtración distribuyendo aliquotas de 100 ml de la solución en frascos estériles con tapón de rosca y los almacenamos a -20°C .

2.6.7 PLA_2 (EC 3.1.1.4) de *N. mocambique*

Preparamos las concentraciones de PLA_2 (1,865 unidades por mg de sólido, 1,865 unidades por mg de proteína, $\text{pI} = 8.8$) de acuerdo a nuestras necesidades de ensayo en SSB.

2.6.8 Preparación del MTT

Preparamos 10 ml de una solución de 2 mg/ml de MTT en SSB y la esterilizamos por filtración con membranas de nitrocelulosa con poro de $0.22 \mu\text{m}$. Almacenamos a 4°C a resguardo de la luz hasta su uso.

2.6.9 Preparación del PMS

Preparamos 5 ml de una solución de 3.55 mg/ml de PMS en agua desionizada y la esterilizamos por filtración con membranas de nitrocelulosa con poro de $0.22 \mu\text{m}$. Almacenamos a 4°C a resguardo de la luz hasta su uso..

2.6.10 Isopropanol Acidificado 0.04 M

Mezclamos 2 ml de HCl 1 M con 48 ml de isopropanol. Almacenamos a temperatura ambiente.

2.6.11 Colorante de Wright

Mezclamos 0.28 g del colorante de Wright con 100 ml de metanol. Agitamos 1 h tapado y filtramos en papel Whatman No.1. Almacenamos en frascos ámbar hasta su uso.

2.6.12 Solución de Azul de Tripano al 0.1%

Disolvimos 0.1 g de azul de tripano en 100 ml de SSB.

2.6.13 Solución de Alsever 10 X

Mezclamos y disolvimos citrato trisódico (5.37 g), ácido cítrico-H₂O (1.87 g), glucosa (dextrosa) (5.36 g) y cloruro de sodio (5.27 g) en agua bidestilada, aforamos la solución a 100 ml y la esterilizamos por filtración, a través de una membrana de nitrocelulosa (con poros de 0.22 µm) y llenamos tubos para cultivo con 10 ml de esta solución. Tapamos bien los tubos y los almacenamos a -20°C.

Preparamos la solución de trabajo descongelando el contenido de un tubo de solución 10 X y diluyéndola con 90 ml de agua bidestilada estéril. Usamos inmediatamente esta solución isotónica (290 mOsm/kg).

2.6.14 Polymorphprep® (GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y., USA)

Es una solución estéril para el aislamiento de granulocitos polimorfonucleares (PMN) de sangre total en un sólo paso; está compuesta de 13.8% (p/v) de metrizoato de sodio y 8.0% (p/v) de dextrans 500. Tiene una densidad de 1.113 ± 0.001 g/ml y una osmolaridad de 460 ± 5 mOsm/Kg.

El producto es estable durante 5 años conservandolo estéril y protegido de la luz a temperatura ambiente (20°C).

3. METODOS

3.1 Tratamiento del Material Para el Cultivo de Amibas

3.1.1 Lavado

El lavado del material de borosilicato para el cultivo de amibas (tubos, botellas y frascos) comprendió los siguientes pasos: 1) enjuague, durante por lo menos 24 h en hipoclorito de sodio, diluido al 1% en agua de la llave; 2) tallado con escobillón y 4 enjuagues con agua de la llave; 3) enjuague por lo menos 24 h con ácido clorhídrico diluido al 1% con agua de la llave, 4) tallado con escobillón y 7 enjuagues con agua de la llave; 5) tres enjuagues con agua destilada y 6) secado en horno a 200°C por 3 h con el material colocado boca abajo en canastillas metálicas.

Las pipetas serológicas (Bellco Glass Inc. N.J., USA) y las pipetas Pasteur las lavamos de la siguiente manera: 1) remojo en PCC-54 al 2% en pipeteros de polipropileno (Nalgene, Labware Division, N.Y., USA) por lo menos 24 h; 2) enjuague en un sifón para lavar pipetas (Nalgene) por lo menos 2 h; 3) dos enjuagues por inmersión en pipeteros con agua destilada; 4) secado en horno a 200°C por 3 h.

Los bulbos contaminados con material biológico y los tapones de los recipientes de cultivo los remojaamos en cloruro de benzalconio (dermo-Qrit; DERMO, MEX) al 1% por lo menos 24 h y enjuagamos 7 veces con agua de la llave y 4 veces con agua destilada, después los dejamos escurrir boca abajo a temperatura ambiente para secarlos.

3.1.2 Esterilización del Material

En general, todo el material de borosilicato para el cultivo de amibas y células de mamífero lo esterilizamos en autoclave. Los tubos, frascos y botellas los esterilizamos

con los tapones flojos los cuales apretamos al terminar el tiempo de esterilización estando aún calientes los tubos. El material así esterilizado lo almacenamos protegido del polvo a temperatura ambiente, hasta su uso.

3.2 Cultivos Axénicos de *Entamoeba histolytica* Cepa HM-1:IMSS

3.2.1 Resiembra y Mantenimiento

Antes de cada resiembra observamos los cultivos en un microscopio invertido (Biovert, Reichert, Austria) para comprobar el buen estado morfológico y la movilidad de las amibas. De los tubos observados escogimos el mejor cultivo y lo colocamos en agua-hielo de 10 a 15 min al término de los cuales homogenizamos el cultivo por inversión suave del tubo (5 a 6 veces) y determinamos la densidad celular en un hematocitómetro (American Optical, Scientific Instruments Div., NY, USA).

En cada resiembra sembramos 3 tubos con 11 ml de PEHPS con un inóculo de 1×10^3 trofozoítos/ml cada uno y los incubamos a 37°C; repetimos este protocolo cada 3 días, cuando las amibas se encuentran en el segundo tercio de su fase logarítmica de crecimiento.

3.2.2 Curva de Crecimiento

Inoculamos 30 tubos de cultivo (PEHPS) con 1×10^3 amibas/ml e incubamos a 37°C. Cada 24 h determinamos la densidad celular de 3 tubos en un hematocitómetro. Con los datos obtenidos calculamos la media y desviación estándar a cada intervalo de la curva de crecimiento y con los valores obtenidos, por regresión lineal, calculamos el incremento y el tiempo de duplicación celular.

3.2.3 Obtención de la Biomasa Amibiana (Cultivos Masivos)

Obtuvimos la biomasa amibiana necesaria cultivando axénicamente la cepa HM1 en suspensión en frascos para cultivos masivos “spinners” usando PEHPS como medio de cultivo (72, 73). Inoculamos 1×10^4 amibas/ml en cada “spinner” e incubamos 48 h a 37°C en condiciones estáticas, y 24 h en agitación (50 rpm) a 37°C.

3.3 Obtención de Extractos Celulares

3.3.1 Cosecha Amibiana y Obtención de P30

Enfriamos los spinners conteniendo los trofozoítos creciendo en su fase logarítmica por 15 min en agua-hielo. A partir de aquí todo el proceso lo desarrollamos a 4°C. Lavamos los cultivos masivos amibianos con PBS centrifugándolos a 1,200 x g por 10 min. Resuspendimos el sedimento con 2 volúmenes de PBS y lo homogeneizamos con un homogeneizador tipo Elvejem Pother (50 golpes) para obtener un extracto total. Este extracto lo centrifugamos a 135 x g por 15 min para obtener la fracción nuclear y el sobrenadante correspondiente, éste sobrenadante lo centrifugamos a 30,000 x g por 15 min para obtener el sedimento correspondiente a la fracción P30 (Fig.1), esta fracción la resuspendimos en 2 volúmenes de PBS y la guardamos a -70°C hasta su uso.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.4 Cuantificación de Proteínas

Determinamos la concentración de proteínas en muestras biológicas particuladas mediante el método de Lowry y col. (75). Las concentraciones de las fracciones cromatográficas fueron determinadas espectrofotométricamente, tomando como base que $1 A_{280} = 1 \text{ mg/ml}$ en celdas de cuarzo de 1 cm de trayectoria óptica.

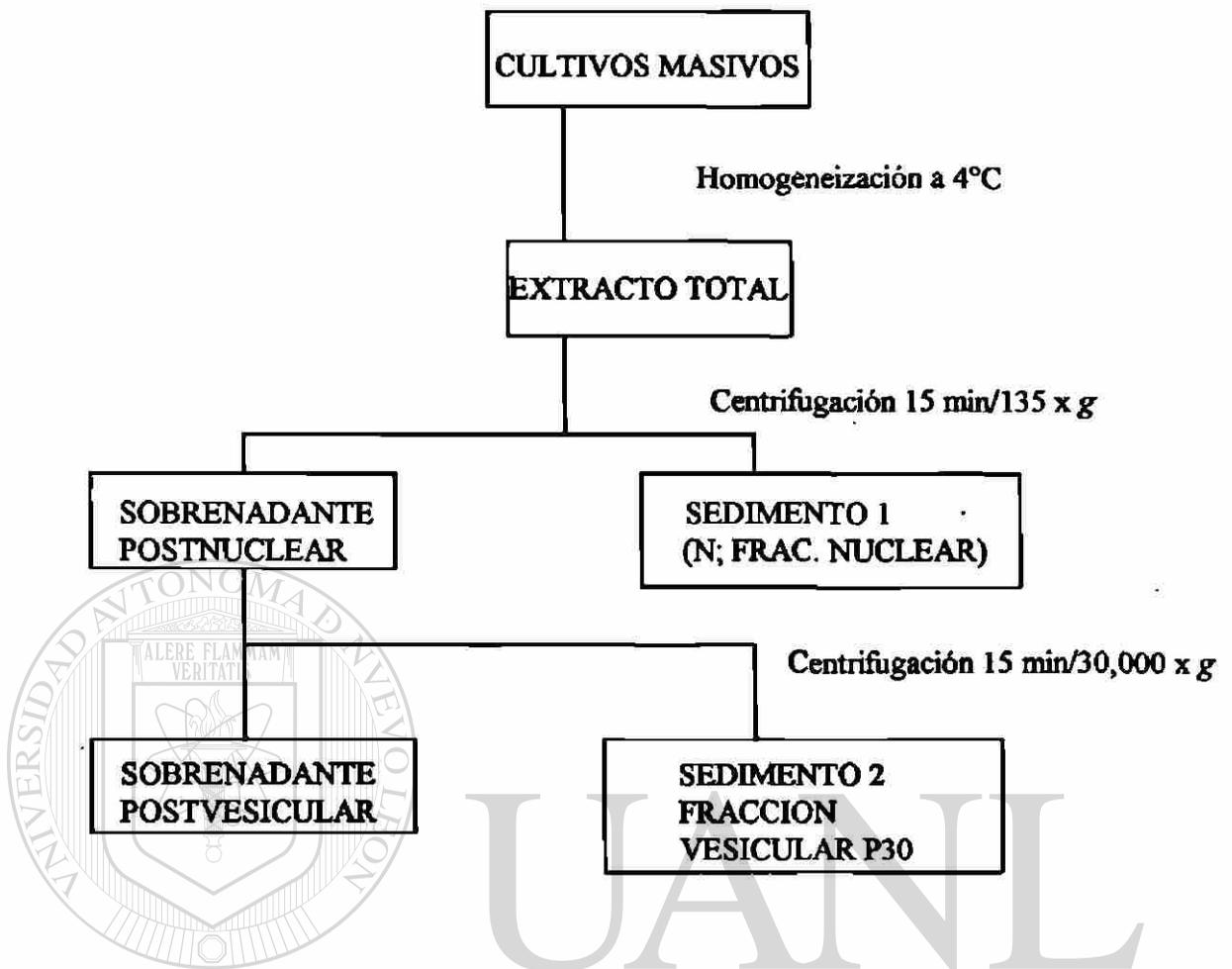


Fig. 1. Diagrama de flujo de la obtención de la fracción vesicular P30 de *E. histolytica*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.5 Determinación de la Actividad Fosfolipásica

3.5.1 Cromatografía en placa fina

Comprobamos la actividad de fosfolipasa de tipo A_2 de la fracción P30 utilizando como substrato L-1-dipalmitoil -[palmitoil-1- ^{14}C]-fosfatidilcolina ($[^{14}C]$ FC). Este substrato está marcado en el carbón 1 del ácido palmítico esterificado en la posición 2 del glicerol, considerando que si la radioactividad se localizaba en la mancha cromatográfica correspondiente a $[^{14}C]$ ácidos grasos libres (AGL), la fosfolipasa sería de tipo A_2 .

Diluimos los lípidos marcados con fosfatidilcolina (FC) de yema de huevo a una concentración específica de 1800 $\mu\text{Ci}/\text{mole}$ y solubilizada en presencia de 0.4% de tritón X-100. Analizamos los productos de la hidrólisis, según el método descrito por Oppendoes (55), después de incubar a 37°C por 2.5 h, paramos la reacción con 25 μl de una mezcla conteniendo 0.75 mg/ml de FC, 1 mg/ml de AGL y 1 mg/ml de lisofosfatidilcolina (LFC) en ácido tricloroacético-butanol (5%), agitamos los tubos en un vórtex y aplicamos 25 μl de cada muestra en placas cromatográficas de sílica gel (Whatman, de borosilicato, 10 x 10 x 1 cm), separamos los productos de la hidrólisis usando una mezcla de disolventes para lípidos polares (cloroformo-metanol-ácido acético-agua, 170:40:16:8). Después colocamos las placas en una cámara saturada con vapor de yodo donde las manchas lipídicas se revelaron como puntos amarillos o cafés sobre fondo blanco. Colectamos cada una de las manchas por separado raspándolas con una navaja de bisturí. Mezclamos cada mancha con 5 ml de mezcla para centelleo líquido en viales de borosilicato de 20 ml de capacidad y determinamos la radioactividad en las manchas correspondientes a FC, LFC, y AGL, la cuantificación la hicimos en un espectrofotómetro de centelleo líquido. La radioactividad la encontramos en las manchas correspondientes a [^{14}C] ácidos grasos libres, lo cual significó la presencia de actividad fosfolipásica de tipo A_2 en los extractos amibianos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

3.6 Cultivo de Células de Chang

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.6.1 Resiembra y Mantenimiento

A partir de una botella de cultivo de 25 cm^2 (Falcon, CA, USA) con una monocapa confluyente de células de Chang, retiramos por succión el medio de cultivo en condiciones asépticas y agregamos 2 ml de tripsina al 0.25%. Incubamos 5 min a 36°C y agregamos 4 ml de medio de cultivo completo. Resuspendimos suavemente y transferimos la solución a un tubo cónico graduado de 12 ml, estéril y con tapón de rosca. Lavamos 2 veces con SSB centrifugando a 600 x g por 5 min (cosecha celular). Resuspendimos el paquete celular con 5 ml de medio de cultivo completo y contamos en un

hematocitómetro. Sembramos 1×10^3 células/ml en botellas de cultivo nuevas y agregamos a cada una 4 ml de medio de cultivo completo. Incubamos a 36°C con atmósfera húmeda y 5% de CO_2 con los tapones semiflojos.

3.6.2 Crioconservación de las Células de Chang

Cosechamos las células en un tubo cónico graduado como lo describimos anteriormente y las resuspendimos en medio de cultivo completo con 10% de dimetilsulfóxido y 20% de suero fetal de bovino. Ajustamos la densidad celular a 1×10^6 células por ml. Colocamos 1 ml de esta suspensión celular en tubos estériles de polipropileno de 2 ml (A/S Nunc, CA, USA) y las congelamos 3 h a -20°C , 3 h a -70°C y finalmente las almacenamos en N_2 líquido (-196°C).

3.6.3 Descongelamiento de las Células de Chang

Tomamos un tubo conteniendo el cultivo celular congelado e inmediatamente lo pusimos a 36°C en baño maría hasta descongelarlo. Distribuimos el contenido en 2 botellas de cultivo de 25 cm^2 y agregamos 4 ml de medio de cultivo completo a cada una. Incubamos hasta que las células se adherieron al sustrato (2 h) y cambiamos el medio de cultivo por medio nuevo para eliminar el dimetilsulfóxido.

3.6.4 Limpieza de la incubadora de CO_2

Cerramos los tapones de todas las botellas de cultivo y colocamos los cultivos en un lugar seguro y sin corrientes de aire. Lavamos las charolas con SDS al 1% y después con etanol comercial al 96%. Las esterilizamos en el horno a 200°C por 3 h. Lavamos el recipiente de agua y el interior de la incubadora con SDS al 1% y enjuagamos con agua destilada. Lavamos con etanol y lo dejamos evaporar. Llenamos el recipiente con agua destilada, colocamos un juego de charolas previamente lavadas y horneadas e incubamos nuevamente los cultivos celulares aflojando los tapones de las botellas de cultivo.

3.6.5 Curva de Crecimiento de las Células de Chang

Sembramos 1×10^4 células de Chang en cajas Petri de plástico de 2 ml e incubamos a diferentes tiempos a 36°C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Cada 24 h a cada una de las cajas le retiramos el medio de cultivo y le agregamos 1 ml de tripsina al 0.25%, incubamos 10 min en las condiciones anteriores y le agregamos 1 ml de medio de cultivo completo. Homogeneizamos y determinamos la densidad celular de cada caja (por triplicado) en un hematocitómetro.

3.7 Recolección y Purificación de los LPMN Humanos (Fig. 2).

3.7.1 Preparación de las Muestras de Sangre

Usamos sangre humana total heparinizada. Todo el proceso de separación de los LPMN lo llevamos a cabo a temperatura ambiente. Procesamos la sangre antes de cumplir 2 h después de obtenida del donador.

3.7.2 Preparación del Gradiente de Polymorphprep®

Colocamos cuidadosamente 5 ml de sangre total sobre 3.5 ml de Polymorphprep® en un tubo de polipropileno de 12 ml, evitando mezclar la sangre con el líquido de separación, permitiendo así, la formación del gradiente de separación.

3.7.3 Separación de los LPMN

Centrifugamos las muestras sobre el Polymorphprep® a 450-500 x g por 25 min en una centrífuga con rotor de ángulo variable a 20°C.

3.7.4 Recuperación de LPMN

Después de la centrifugación observamos 2 bandas de leucocitos. La banda superior en la interfase muestra/medio consiste de células mononucleares, mientras que en la segunda banda inferior se encuentran los LPMN. Los globulos rojos sedimentaron al fondo del tubo. Cosechamos las bandas celulares por punción del tubo con una jeringa de tuberculina y diluimos la fracción con los LPMN con un volumen de una solución de NaCl 0.45% para restaurar la osmolaridad normal.

3.7.5 Lavado de los LPMN

Transferimos la suspensión celular a un tubo de 3 ml y añadimos 5 ml de SSB. Centrifugamos a 400 x g por 10 min a 20°C. Resuspendimos los LPMN en 5 ml de SSB y repetimos el lavado una vez más .

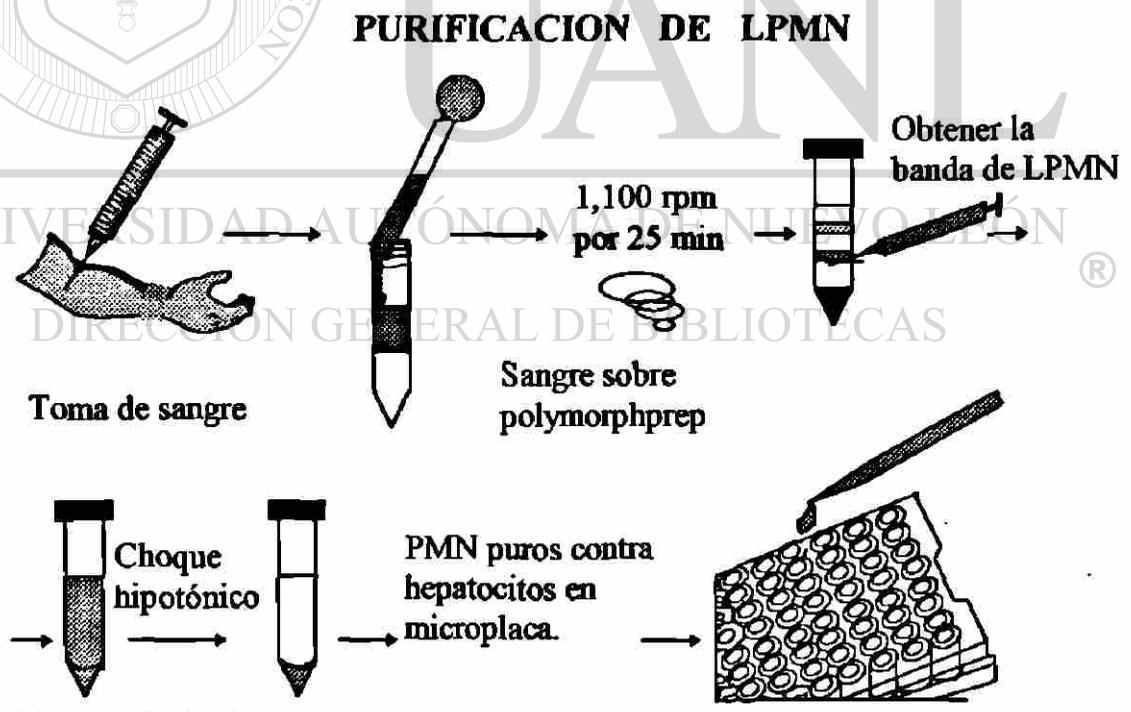


Figura 2. Método de Obtención y Purificación de LPMN.

3.7.6 Lisis de los Eritrocitos

Retiramos el sobrenadante y resuspendimos el paquete de LPMN en 500 μl de SSB, agregamos 1,500 μl de agua desionizada fría (4°C) y resuspendimos para eliminar los eritrocitos contaminantes, agregamos 290 μl de solución de NaCl al 3% para restaurar la osmolaridad y 5 ml de SSB. Centrifugamos 5 min a 400 x g. Resuspendimos en 4 ml de SSB y determinamos la densidad mediante cuenta en un hematocitómetro.

3.7.7 Tinción de los LPMN

Hicimos frotis a partir de cada una de las bandas y los teñimos con el colorante de Wright. Comprobamos con observaciones al microscopio de contraste de fases la presencia de PMN en su banda correspondiente y la ausencia de éstos en las demás bandas. Después de la purificación comprobamos la viabilidad de los LPMN en SSB utilizando azul de tripano.

3.8 Modelo Colorimétrico Para Determinar Citotoxicidad Usando MTT

3.8.1 Siembra de la Microplaca

A una caja de cultivo con monocapa confluyente retiramos el medio por succión con vacío y agregamos 2 ml de tripsina al 0.25%. Incubamos 10 min a 37°C hasta que las células se despegaron de la caja. Agregamos 5 ml de medio de cultivo completo y resuspendimos suavemente. Pasamos toda la suspensión celular a un tubo cónico graduado de vidrio de 12 ml con tapón de rosca, estéril y lavamos 2 veces centrifugando a 600 x g por 5 min. Retiramos el sobrenadante y resuspendimos en 4 ml de medio de cultivo completo. Contamos el número de células en un hematocitómetro y preparamos una suspensión de 1.5×10^5 células/ml. Sembramos 3×10^4 células en 200 μl de MEM completo por pozo en microplacas de poliestireno de 96 pozos (Corning Glass Works; Corning, New York 14831). Incubamos 24 h a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 para que se forme la monocapa confluyente.

3.8.2 Ensayo Colorimétrico

Lavamos 2 veces cada pozo con 200 μ l de SSB. Agregamos 25 μ l del agente o suspensión celular o la mezcla de ambos a probar e incubamos 1 h o tiempos variables a 36°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Luego de la incubación lavamos cada pozo 2 veces con 200 μ l de SSB y agregamos 50 μ l de MTT 4.82 mM (0.1 mg en SSB) u otra concentración si se indica y 10 μ l de PMS 1.89 mM (0.035 mg en agua desionizada) por pozo. Incubamos 75 min o tiempos variables a 36°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Lavamos como en el paso anterior y agregamos 210 μ l de alcohol isopropílico acidificado (HCl 0.04 M en isopropanol). Dejamos reposar aproximadamente 10 min y resuspendimos con pipeta de repetición. Pasamos el sobrenadante a una microplaca nueva y leímos su absorbancia a 545 nm con un filtro diferencial de 630 nm en un lector de microplacas (EIA multiwell reader, Sigma Diagnostics) (Fig. 3). Para calcular la dosis citolítica media del agente dado utilizamos el análisis de regresión lineal y análisis de correlación (75).

MODELO COLORIMETRICO (MTT)

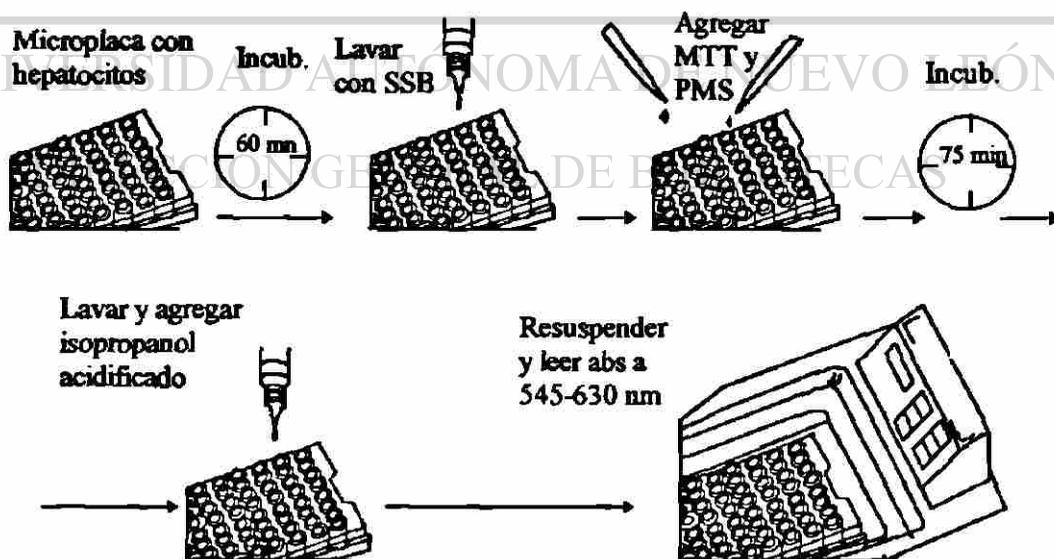


Figura 3. Determinación de la viabilidad, toxicidad y activación celular utilizando una sal de tetrazolio (MTT).

3.8.3 Determinación del Tiempo Optimo de Reducción del MTT

A 16 series de tres pozos con monocapas de células de Chang lavadas con SSB agregamos 50 μl de MTT 4.82 mM; a un grupo de 8 series le agregamos 10 μl de PMS 1.89 mM y al otro grupo le agregamos 10 μl de SSB. Incubamos de 0 a 120 min a 36°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. Cada 15 min lavamos una serie de cada grupo, 2 veces con 200 μl de SSB. Proseguimos el método como describimos anteriormente.

3.8.4 Determinación de la Mejor Longitud de Onda Para Registrar la DO Producida por la Reducción del MTT

Luego de disolver los cristales de formazán formados por la reducción del MTT por monocapas confluentes de células de Chang, determinamos su absorbancia en longitudes de onda desde 320 nm hasta 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU® 650i.

3.8.5 Determinación de la Concentración Optima de MTT en Nuestro Modelo

A series de tres pozos con monocapas de células de Chang lavadas con SSB agregamos 50 μl de MTT (en concentraciones de 1, 2, 4 y 8 mg/ml) y 10 μl de PMS (1.89 mM). Proseguimos con el método como describimos anteriormente.

3.8.6 Relación Entre la Densidad Celular y la Reducción del MTT

Sembramos cantidades variables de células (desde 5×10^3 hasta 6×10^4) en 200 μl de medio MEM completo por pozo en microplacas de 96 pozos. Incubamos los cultivos por 20-24 h a 36°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ para que se formara la monocapa. Lavamos 2 veces los pozos con 200 μl de SSB cada vez. Agregamos 25 μl de SSB e incubamos por 1 h en las condiciones mencionadas. Lavamos los pozos 2 veces con 200 μl de SSB y agregamos 50 μl de MTT (4.82 mM) y 10 μl de PMS (1.89 mM). Incubamos 75 min en las condiciones anteriores. Proseguimos con el método como describimos anteriormente.

3.8.7 Determinación de la DC₅₀ del Tritón X-100

A series de tres pozos con monocapas de células de Chang lavadas con SSB agregamos 25 µl de Tritón X-100 a diferentes concentraciones (de 0.0005 a 0.5% v/v) e incubamos por 1 h a 36°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. En seguida, lavamos con SSB, agregamos el MTT y el PMS y proseguimos como se indica anteriormente.

3.9 Determinación de la DH₅₀ de la PLA₂ de *N. mocambique* y de P30

Calculamos la potencia hemolítica de la PLA₂ mediante la liberación porcentual de hemoglobina. Colectamos 5 ml de sangre de rata tipo Sprague Dawley en tubo de ensaye conteniendo solución de Alsever (1:1; v/v). Centrifugamos a 2,000 rpm/15 min a temperatura ambiente y desechamos el sobrenadante junto con los leucocitos. Obtuvimos los eritrocitos y los lavamos con SSB (1:1; v/v). Retiramos el sobrenadante y distribuimos los eritrocitos en tubos de polipropileno (eppendorf de 1.5 ml) para guardar a 4°C. Tomamos 150 µl de este paquete de eritrocitos y lo diluimos en 625 µl de SSB (solución al 20%). De esta solución, distribuimos 25 µl en tubos eppendorf de 1.5 ml y agregamos a cada uno concentraciones variables de PLA₂ de *N. mocambique* (desde 0.681 ng hasta 17.04 ng) en 25 µl de SSB o concentraciones variables de P30 (desde 6.25 hasta 50 µg de proteína) en 25 µl de SSB. Incubamos 1 h a 37°C para la PLA₂ y 3 h a 37°C para la P30. A los tubos de prueba agregamos 1 ml de SSB; a los controles positivos agregamos 1 ml de agua destilada para la liberación total de hemoglobina. Centrifugamos a 4,000 rpm por 2 min (en microfuga Beckman), recobramos el sobrenadante y determinamos la absorbancia a 415 nm utilizando un lector de microplacas (EIA multi-well, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA)

3.10 Determinación de la DC_{50} de la PLA_2 de *N. mocambique*

A series de tres pozos con monocapas de células de Chang lavadas con SSB agregamos 25 μ l de PLA_2 de *N. mocambique* a diferentes concentraciones (de 0 a 17 ng de PLA_2 /pozo) e incubamos por 1 h a 36°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 . Lavamos con SSB, agregamos el MTT y el PMS y proseguimos como indicamos anteriormente.

3.11 Efecto de Concentraciones Variables de Extractos Totales de LPMN Sobre Celulas de Chang en Cultivo

Suspensiones conteniendo diferentes números de LPMN las sometimos a 3 ciclos repetidos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido. Incubamos los extractos celulares de LPMN con las células de Chang en proporciones de LPMN: células de Chang (de 0:1 hasta 100:1) por 1 h a 36°C. Después de este tiempo lavamos los cultivos y agregamos el MTT y el PMS y proseguimos el ensayo como describimos anteriormente. Nuestro control consistió en células de Chang incubadas en SSB en lugar de los extractos de LPMN (100% de células vivas). Después de la interacción, corroboramos la viabilidad de las células de Chang por la exclusión de azul de tripano®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para descartar la posibilidad de que los extractos de los LPMN tuvieran la capacidad de reducir el MTT y encubrir nuestros resultados, incubamos extractos de LPMN solos con MTT y PMS.

3.12 Lisis de Células de Chang por Efecto de la PLA₂ de *N. mocambique* Mediada por LPMN

En este caso el número de células de Chang usadas en nuestros ensayos fue de 7.5×10^3 , de tal manera que al añadir los LPMN tuvieramos una relación de LPMN:hepatocito de 100:1. Preincubamos 1.5×10^6 LPMN con 25 μ l de PLA₂ de *N. mocambique* (usamos PLA₂ en concentraciones de 0 a 21 ng/pozo) por 6 h a 37°C. Agregamos 25 μ l de esta mezcla a los hepatocitos e incubamos 3 h a 36°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Lavamos los pozos para retirar la PLA₂ y los restos celulares resultantes de la acción de la PLA₂. Agregamos MTT y PMS, y proseguimos con el ensayo como describimos anteriormente.

Como un control negativo del efecto de la fosfolipasa mediado por LPMN, usamos eritrocitos humanos en lugar de LPMN. De esta manera sabríamos si el efecto observado sería inespecífico o estuviera claramente vinculado a la actividad de los LPMN. Como la fosfolipasa actúa primariamente sobre la membrana celular y los eritrocitos son de menor tamaño que los PMN, igualamos la superficie de membrana de eritrocitos usados con la que presentan el número de los LPMN usados. Determinamos que 3.5×10^6 eritrocitos tienen la misma superficie de membrana que 1.5×10^6 LPMN.

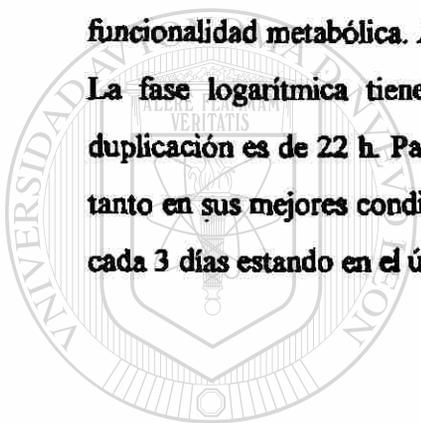
3.13 Efecto de P30 Sobre Células de Chang Mediada por LPMN

Ajustamos las densidades en nuestros cultivos para tener una relación de LPMN:hepatocito (100:1). Preincubamos los LPMN con diferentes concentraciones de P30 ambiente (desde 0 a 50 μ g de P30; tomando en cuenta que 50 μ g de proteína total de P30 = 100 Unidades Hemolíticas) por 6 h a 37°C en tubos cónicos graduados de 12 ml. Agregamos 25 μ l de esta mezcla a 7.5×10^3 células de Chang (preincubadas 24 h en microplacas de 96 pozos) e incubamos 3 h a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Lavamos los pozos para retirar la P30 y los restos celulares en caso de haber ocurrido citólisis o muerte celular por efecto de la P30. Agregamos MTT y PMS y proseguimos con el ensayo como describimos anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1 Curva de Crecimiento de *E. histolytica* Cepa HM1

Una parte importante en el manejo adecuado de los microorganismos y células en cultivo es conocer su curva de crecimiento. El patrón general de crecimiento presenta una fase de acondicionamiento (fase lag), una fase exponencial (fase log), una fase estacionaria y una fase de muerte. La fase de crecimiento exponencial se caracteriza por ser la etapa en la cual las células se encuentran en su fase óptima de crecimiento y funcionalidad metabólica. *E. histolytica* posee este mismo patrón de crecimiento (Fig. 4). La fase logarítmica tiene una duración de 4 días, durante esta fase el tiempo de duplicación es de 22 h. Para conservar los cultivos en fase exponencial continua y por lo tanto en sus mejores condiciones para nuestros experimentos teníamos que subcultivarlas cada 3 días estando en el último tercio de su fase de crecimiento exponencial.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

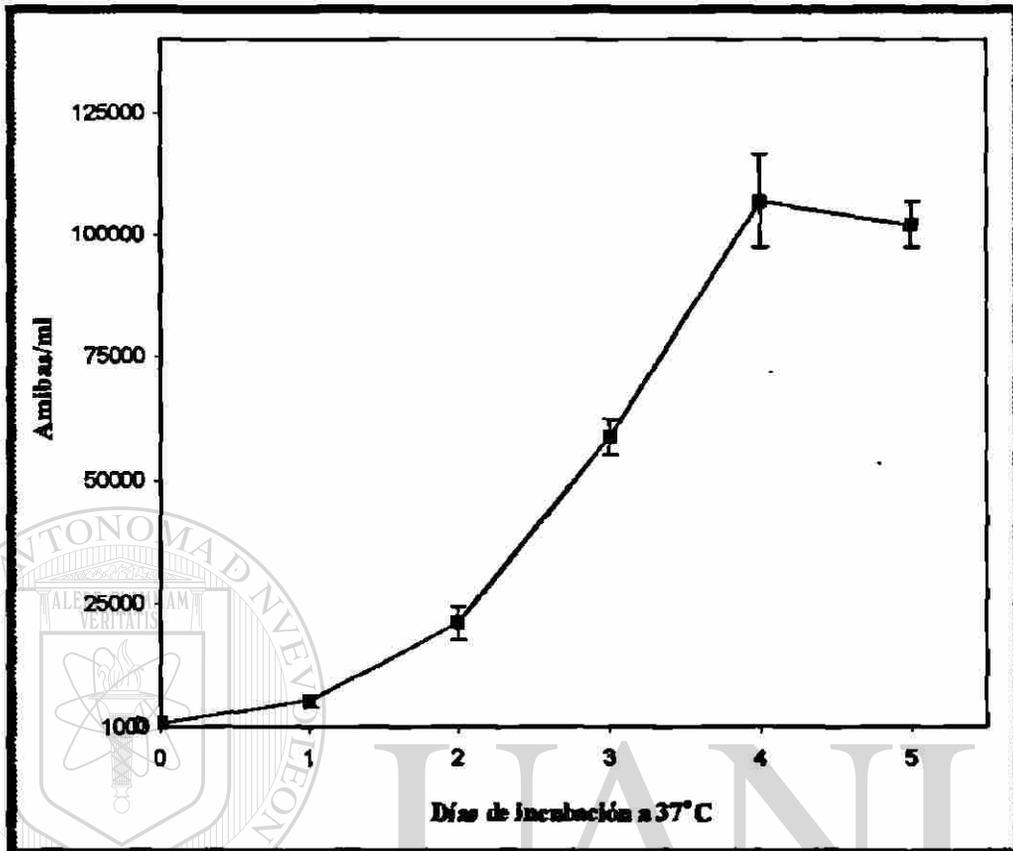


Figura 4. Curva de crecimiento de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS en tubos de cultivo con 11 ml de PEHPS, incubadas a 37°C. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2 Curva de Crecimiento de Células de Chang

El crecimiento de la línea de células de Chang también presenta las fases características de crecimiento (Fig. 5). El tiempo de duplicación de las células fue de 26 h, con un incremento en la densidad celular de 18.3 veces. La fase exponencial tuvo una duración de 6 días por lo que decidimos hacer las resiembras cada 7 días con un inóculo de 1×10^3 células/ml en medio MEM.

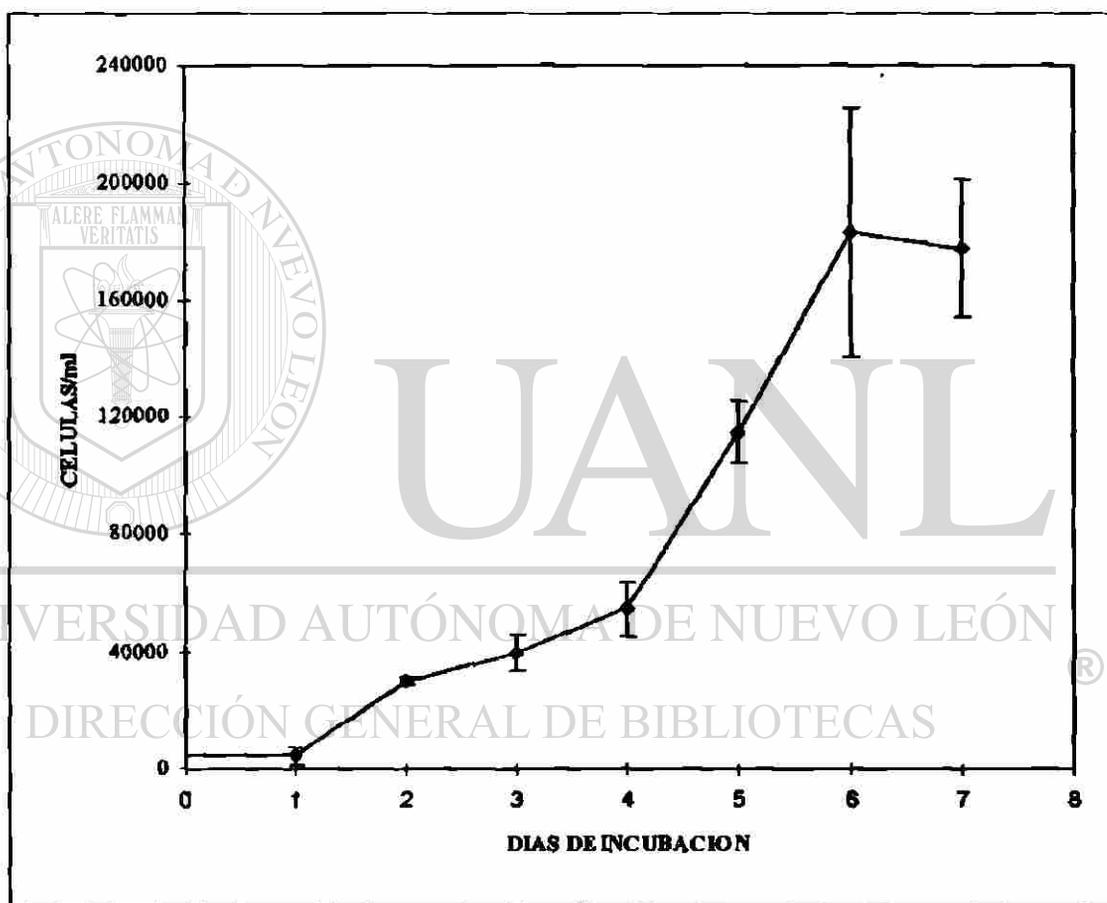


Figura 5. Curva de crecimiento de células de Chang. Sembramos 1×10^4 células en MEM. Cada punto corresponde al promedio de 3 determinaciones. Las células presentaron un tiempo de duplicación de 26 h, incubadas a 36°C en atmósfera húmeda y 5% de CO_2 .

4.3 Estandarización de un Modelo Para Determinar el Efecto de la PLA₂ y de la P30 Sobre Células de Chang

4.3.1 Relación Temporal de la Reducción del MTT por Células de Chang

Las células de Chang tienen la capacidad metabólica para reducir el MTT. El rompimiento del anillo del tetrazolio que lleva al desarrollo de color y por lo tanto a un aumento en la absorbancia está en relación directa con el tiempo de incubación de las células en presencia del MTT. Con el número de células usado (3×10^4) y en presencia de un acarreador de electrones externo (PMS) el proceso de reducción del MTT por las células de Chang llegó a su máximo luego de 75 min de incubación (Fig. 6). Tiempos mayores no producen un aumento en el desarrollo del color. Por lo cual fijamos el tiempo de incubación con MTT en 75 min. (Fig. 6).

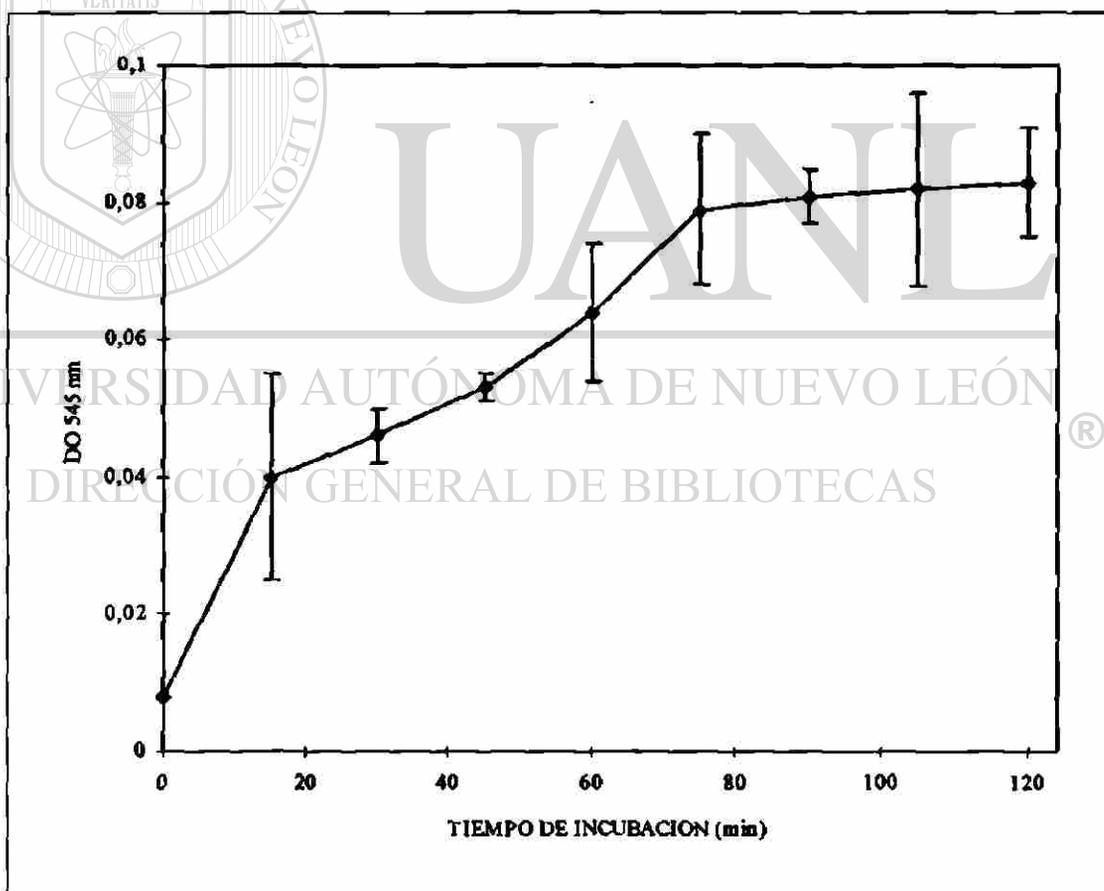


Figura 6. Relación temporal de la reducción del MTT por células de Chang. En microplacas de 96 pozos conteniendo 3×10^4 células por pozo agregamos 25 μ l de MTT (2 mg/ml) y 10 μ l de PMS (3.5 mg/ml) e incubamos a tiempos variables a 36°C. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de 9 determinaciones en 3 experimentos independientes.

4.3.2 Longitud de Onda de Máxima Absorbancia del MTT

Probamos diferentes longitudes de onda para leer la absorbancia que presenta el formazán (producto resultante de la reducción del MTT). Observamos que este compuesto alcanza su máxima absorción de luz a longitudes de onda que van desde 545 hasta 600 nm (Fig. 7); decidimos utilizar la longitud de onda de 570 nm ya que es la referida en otros trabajos donde utilizan el modelo del MTT.

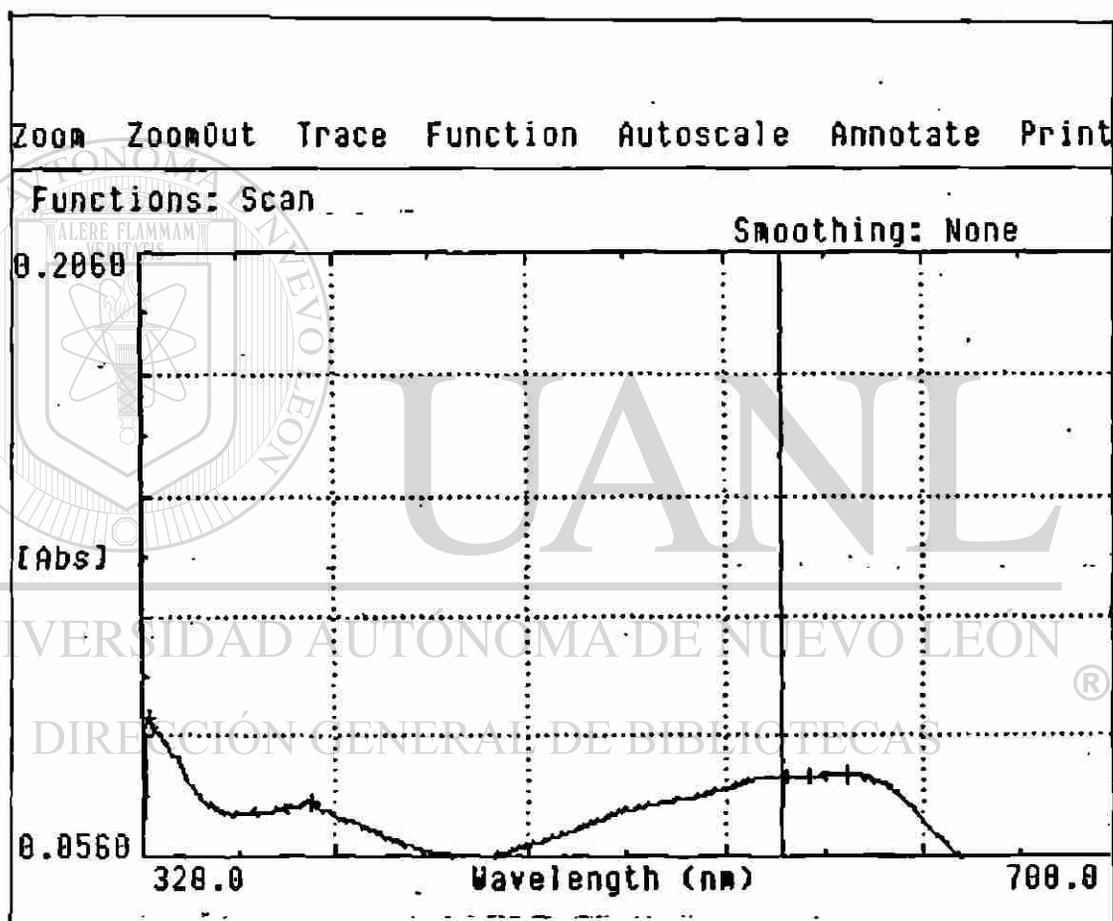


Figura 7. Espectro de absorción del formazán producido por 3×10^4 células de Chang cultivadas en MEM.

4.3.3 Relación Entre Desarrollo de Color y la Concentración de MTT en Células de Chang

Usando un tiempo de incubación de 75 min (tiempo en que ocurre la mayor reducción del MTT), analizamos el efecto de diferentes concentraciones de MTT en el desarrollo de la reacción. Encontramos que al agregar la solución del MTT en concentraciones mayores de 2 mg/ml, se produce una disminución en la eficiencia de la reacción (Fig. 8). Decidimos usar la concentración de 2 mg/ml para nuestros siguientes ensayos por ser ésta la que había sido usada anteriormente en otros estudios.

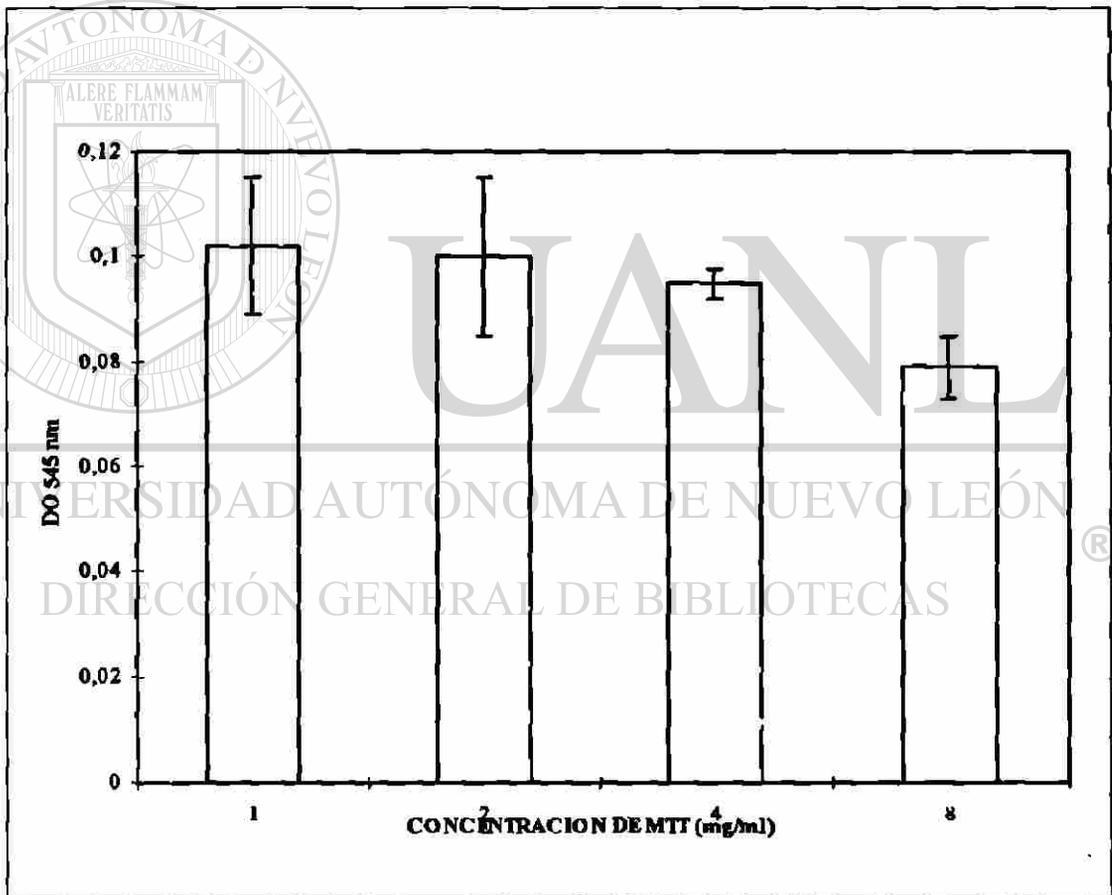


Figura 8. Relación entre la DO y la concentración del MTT en monocapas de células de Chang en microplacas de 96 pozos. A cada concentración le agregamos PMS e incubamos por 75 min a 36°C. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm desviación estándar.

4.3.4 Relación Lineal Entre la Densidad Celular y la Reducción del MTT

Determinamos la relación entre la densidad celular de los cultivos y la reducción del MTT. Observamos que la reducción del MTT es directamente proporcional al número de células vivas obteniendo una $r^2 = 0.996$ con un tiempo fijo de incubación de 1 h a 36°C (Fig. 9). Esto nos aseguró que nuestro modelo podía detectar diferencias en el número de células presentes en un cultivo. Por el hecho de que en los pozos de las microplacas una monocapa se forma con 3×10^4 células, elegimos esta densidad para nuestros ensayos posteriores.

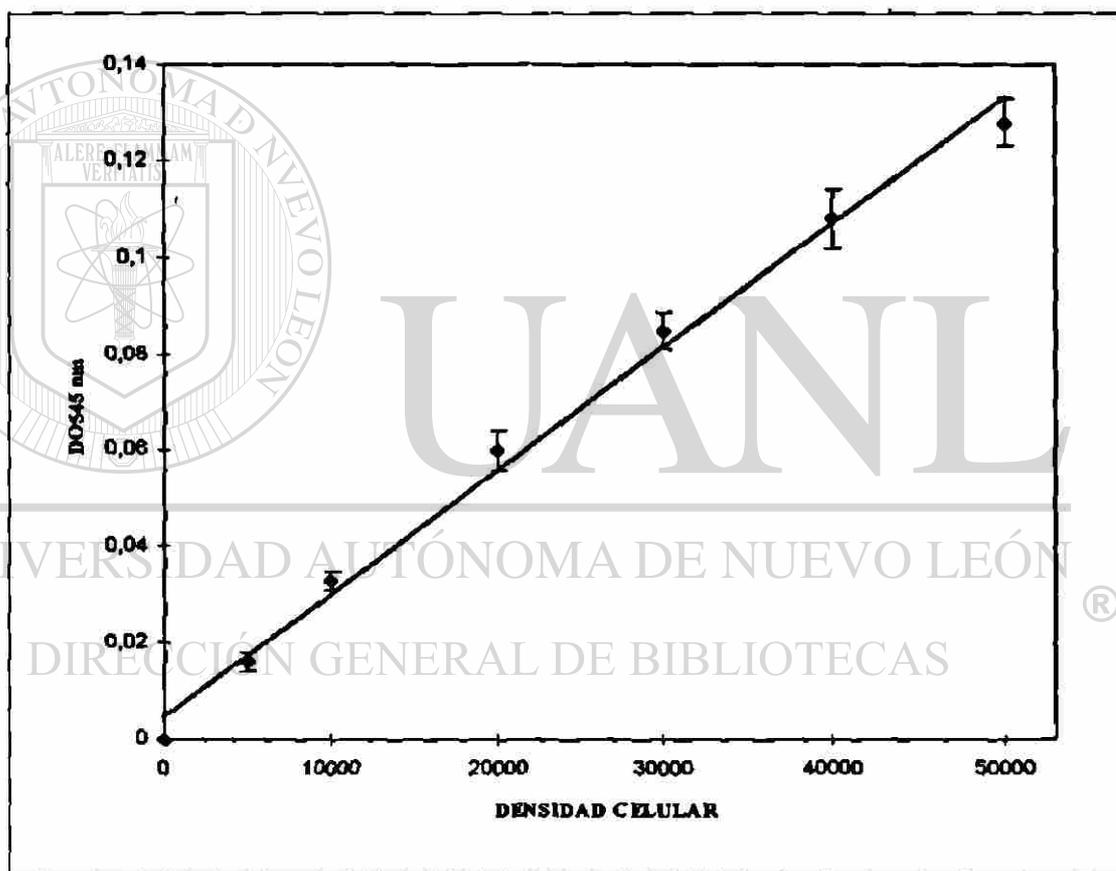


Figura 9. Relación lineal entre la densidad celular y la reducción del MTT. En microplacas de 96 pozos sembramos un número variable de células de Chang y añadimos MTT y PMS. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos por triplicado \pm desviación estándar.

4.4 Efecto Citolítico de Concentraciones Variables de Tritón X-100

Una vez que encontramos las condiciones idóneas para llevar a cabo el modelo del MTT, decidimos probar nuestro modelo utilizando células de Chang y un agente lítico conocido como lo es el Tritón X-100. Cuando utilizamos el detergente Tritón X-100 encontramos una curva sigmoide típica de los agentes líticos. El porcentaje de muerte celular, calculado en base a nuestro control de 100% de células vivas incubadas con SSB, estuvo en relación directa con el aumento en la concentración del detergente utilizado (de 0.025 a 0.05%). Necesitamos una concentración de 0.05% (v/v) del detergente para producir 96% de muerte en una monocapa de células de Chang. Calculamos la DC_{50} en 0.039% del tritón X-100 (v/v). De esta manera comprobamos que nuestro modelo si era adecuado para detectar y cuantificar un efecto citolítico (Fig. 10).

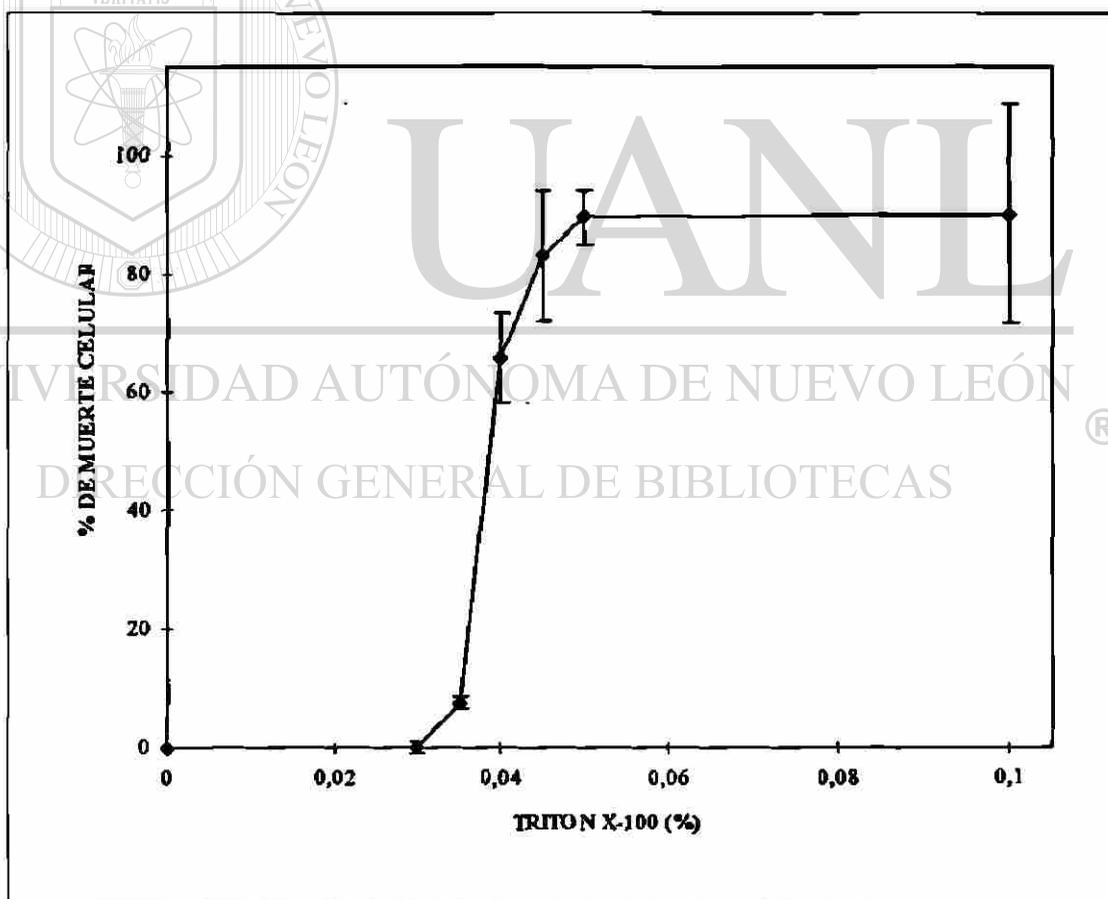


Figura 10. Efecto citolítico de concentraciones variables de tritón X-100 en microplacas de 96 pozos después de 1 h de incubación a 36°C con las monocapas celulares. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos por triplicado \pm desviación estándar.

4.5 Actividad Hemolítica de la PLA₂ de Veneno de Cobra (*N. mocambique*)

Antes de probar la actividad citolítica de la PLA₂ de veneno de cobra fue importante determinar su potencia hemolítica; ya que es un parámetro bien establecido para conocer su nivel de actividad. Determinamos su actividad hemolítica por la liberación porcentual de hemoglobina de glóbulos rojos de rata. Encontramos que la liberación de hemoglobina se incrementa proporcionalmente con concentraciones crecientes de PLA₂ (entre 8.25 y 17.04 ng) (Fig. 11). Calculamos la dosis hemolítica 50 (DH₅₀) de la PLA₂ de *N. mocambique* en 12.17 ng de proteína incubada en un volumen de 25 μ l por 1 h a 36°C, con una solución de eritrocitos al 20%.

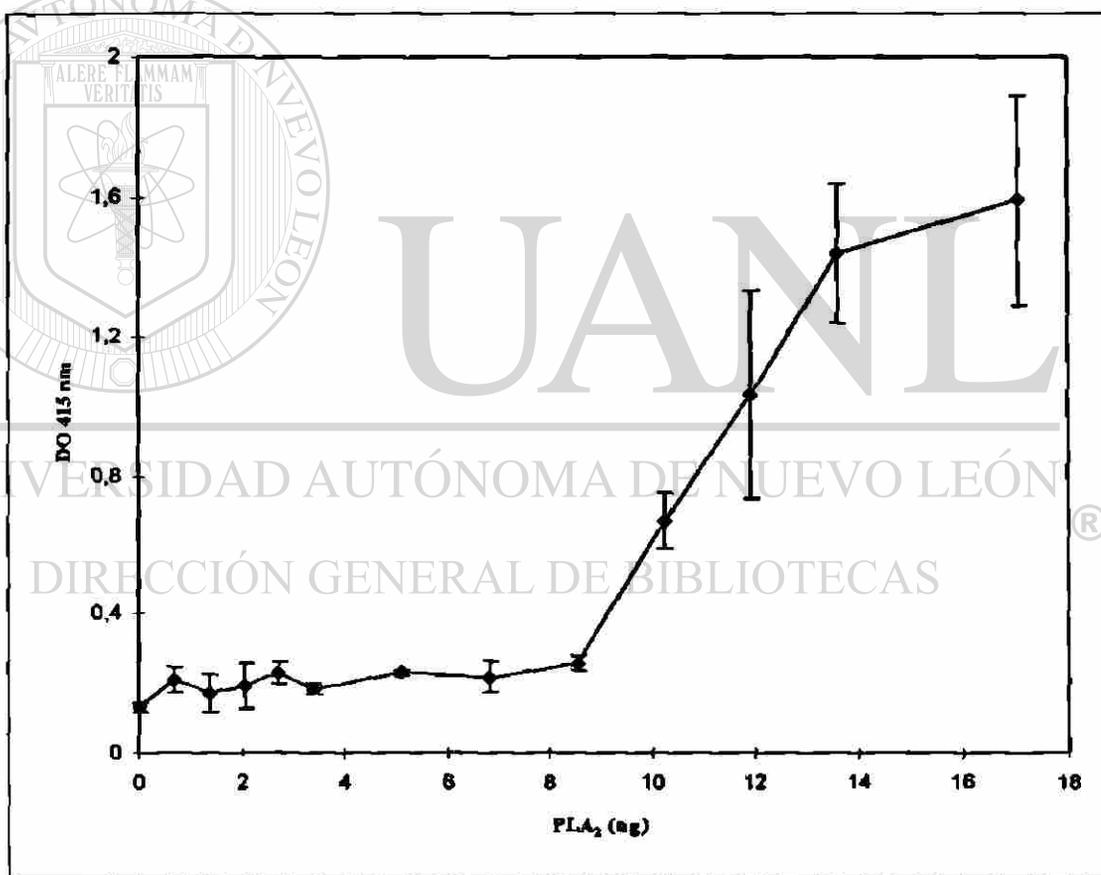


Figura 11. Actividad hemolítica de la PLA₂ de veneno de cobra (*N. mocambique*). Incubamos concentraciones variables de PLA₂ con 25 μ l de una suspensión de eritrocitos al 20% por 1 h a 37°C. Calculamos la hemoglobina liberada con respecto a la lisis total de un número equivalente de eritrocitos lisados por choque hipotónico. La DH₅₀ fue de 12.168 ng. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos por triplicado \pm desviación estándar.

4.6 Actividad Citolítica de la PLA₂ de Veneno de Cobra (*N. mocambique*)

Una vez que determinamos la DH_{50} de la PLA₂ de *N. mocambique* calculamos las concentraciones de proteína a utilizar en nuestro modelo para detectar actividad citolítica.

Considerando que las células nucleadas tienen la capacidad para soportar mejor el ataque de citolisinas por su capacidad regenerativa de membrana y organelos citoplasmicos, estimamos probar concentraciones de PLA₂ 10 veces mayores que las usadas para los eritrocitos. En este caso también encontramos una clara dependencia del aumento de la actividad citolítica con el aumento en la concentración de la fosfolipasa utilizando el modelo del MTT (Fig. 12). Calculamos la dosis citolítica 50 (DC₅₀) en 51 ng de proteína sobre 3×10^4 células de Chang, a 1 h de incubación a 36°C.

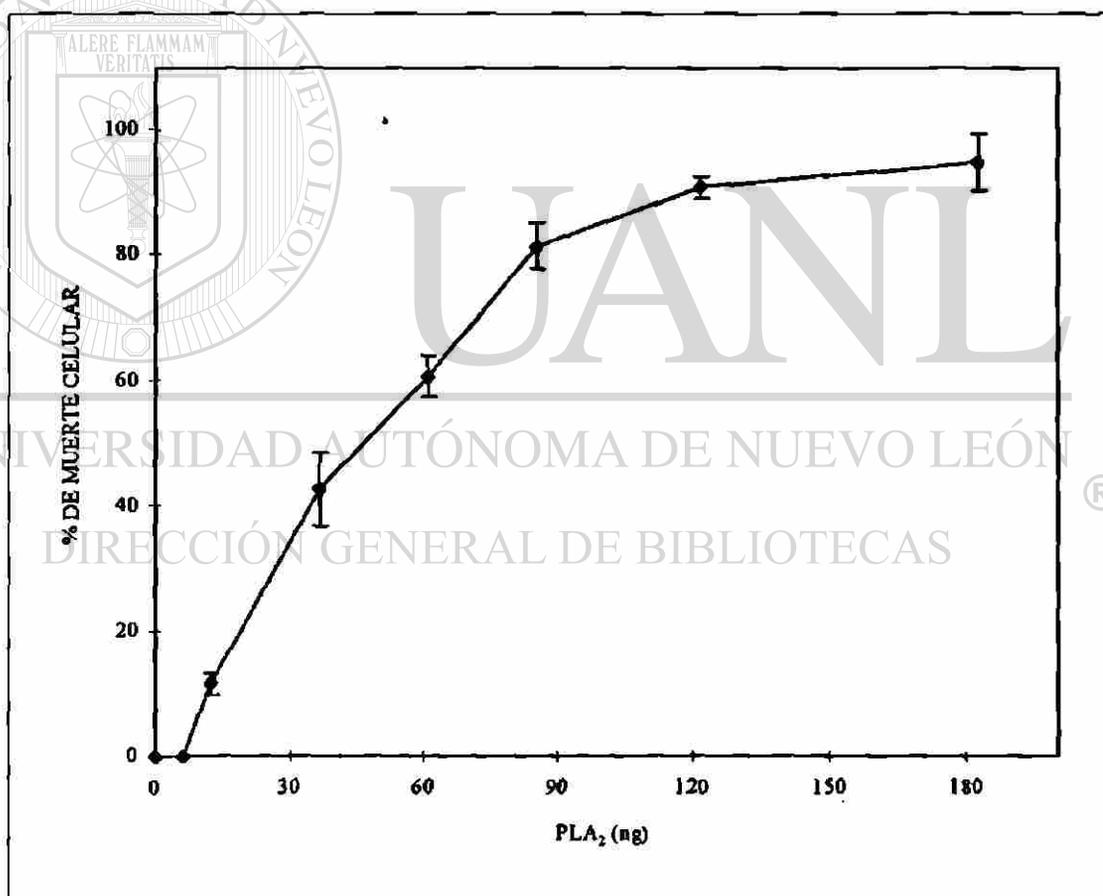


Figura 12. Actividad citolítica de la PLA₂ de veneno de cobra (*N. mocambique*). Determinado por el modelo del MTT. Probamos diferentes concentraciones de PLA₂ sobre monocapas de células de Chang e incubamos 1 h a 36°C. La DC₅₀ fue de 51 ng de proteína. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos por triplicado \pm desviación estándar.

4.7 Actividad Citolítica de la PLA₂ de *N. mocambique* Mediada por LPMN

Determinamos el efecto de concentraciones variables de PLA₂ y de PLA₂ preincubada con LPMN o eritrocitos de rata. Encontramos que la PLA₂ si tiene un efecto lítico sobre las células de Chang. La concentración más alta de PLA₂ (21.3 ng) produjo un 32% de muerte celular. Cuando la fosfolipasa se preincuba por 6 horas con LPMN, el efecto citolítico aumenta significativamente y en relación a la concentración de PLA₂. La concentración de 21.3 ng de fosfolipasa preincubada con LPMN produjo un 53.0% de muerte celular. La preincubación de la PLA₂ con eritrocitos de rata provocó una disminución en la actividad citolítica de la fosfolipasa. La mas alta concentración preincubada con eritrocitos produjo 4.6% de muerte celular (Fig. 13 y Tabla 1).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

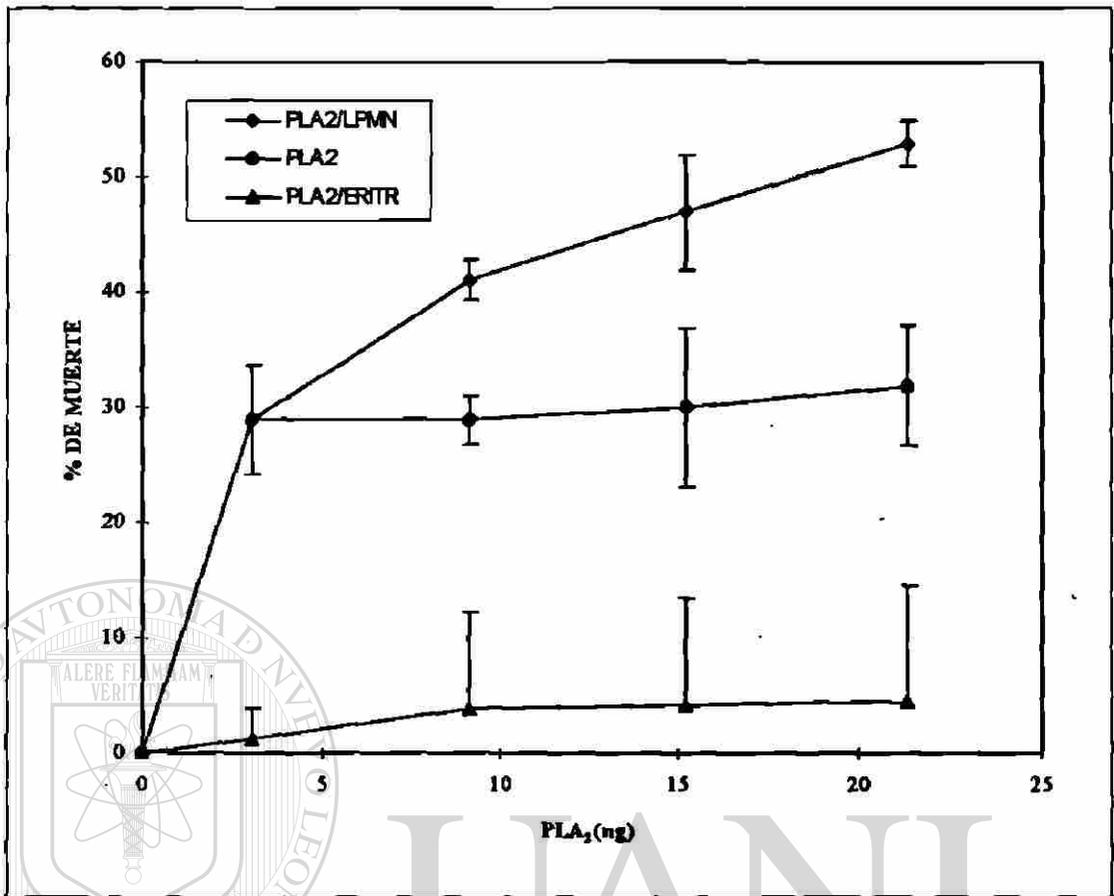


Figura 13. Lisis de células de Chang por efecto de la PLA₂ mediada por LPMN.

(PLA₂/ERITR) PLA₂ preincubada con eritrocitos humanos en cantidad equivalente en superficie de membrana a los LPMN usados en la interacción PLA₂/LPMN.

(PLA₂) PLA₂ preincubada solamente en SSB, sobre células de Chang.

(PLA₂/LPMN) PLA₂ preincubada con LPMN humanos.

Todas las preincubaciones fueron hechas por 6 h, con cantidades equivalentes de PLA₂ y sobre el mismo número de células de Chang.

Cada punto es el promedio de 3 experimentos por triplicado \pm desviación estándar.

TABLA 1.**Potenciación del Efecto Citolítico de PLA₂ de *N. mocambique* Sobre Células de Chang Mediado por LPMN.**

Componentes del ensayo	% de muerte celular		Incremento del efecto citolítico
	Absoluta	Relativa	
PLA ₂ + eritrocitos + células de Chang	4.6 ± 10.2	1	-
PLA ₂ + células de Chang	32 ± 5.2 *	6.96	6.96
PLA ₂ + LPMN + células de Chang	53 ± 2 *	11.52	11.52

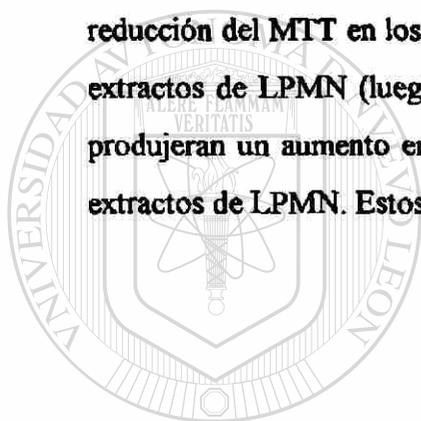
- ◆ El número de eritrocitos usados (3.5×10^6) fue equivalente a la superficie membranal ($5.7 \times 10^8 \mu\text{m}^2$) dada por 1.5×10^6 LPMN humanos.
 - ◆ Concentración de PLA₂ de *N. mocambique* 21.3 ng equivalente a 1.8 DH₅₀.
 - ◆ Número de LPMN por pozo fue de 1.5×10^6 LPMN humanos
 - ◆ El número de células de Chang en todos los ensayos fue de 1.5×10^4 .
- * Diferencia significativa ($\alpha = 0.01$) entre los tratamientos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.8 Efecto de Concentraciones Variables de Extractos Totales de LPMN Sobre Células de Chang

Extractos de una suspensión de LPMN (a una concentración de 1.5×10^6) obtenidos por 3 ciclos repetidos de congelación-descongelación con N_2 líquido no lisaron a las células de Chang, cuando los ensayamos por el modelo del MTT. Comprobamos estos resultados por la exclusión de azul de tripano, las células de Chang preincubadas con 25 μ l de extractos de LPMN (en proporción equivalente hasta de 1:100) no resultaron alteradas en su viabilidad. Sin embargo, si observamos que los extractos de LPMN estimularon el metabolismo de los hepatocitos, pues encontramos un aumento en la reducción del MTT en los cultivos tratados (Fig. 14). Para descartar que residuos de los extractos de LPMN (luego de los lavados) tuvieran la capacidad de reducir el MTT y produjeran un aumento en la absorbancia determinamos la reducción del MTT por los extractos de LPMN. Estos no redujeron el MTT.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

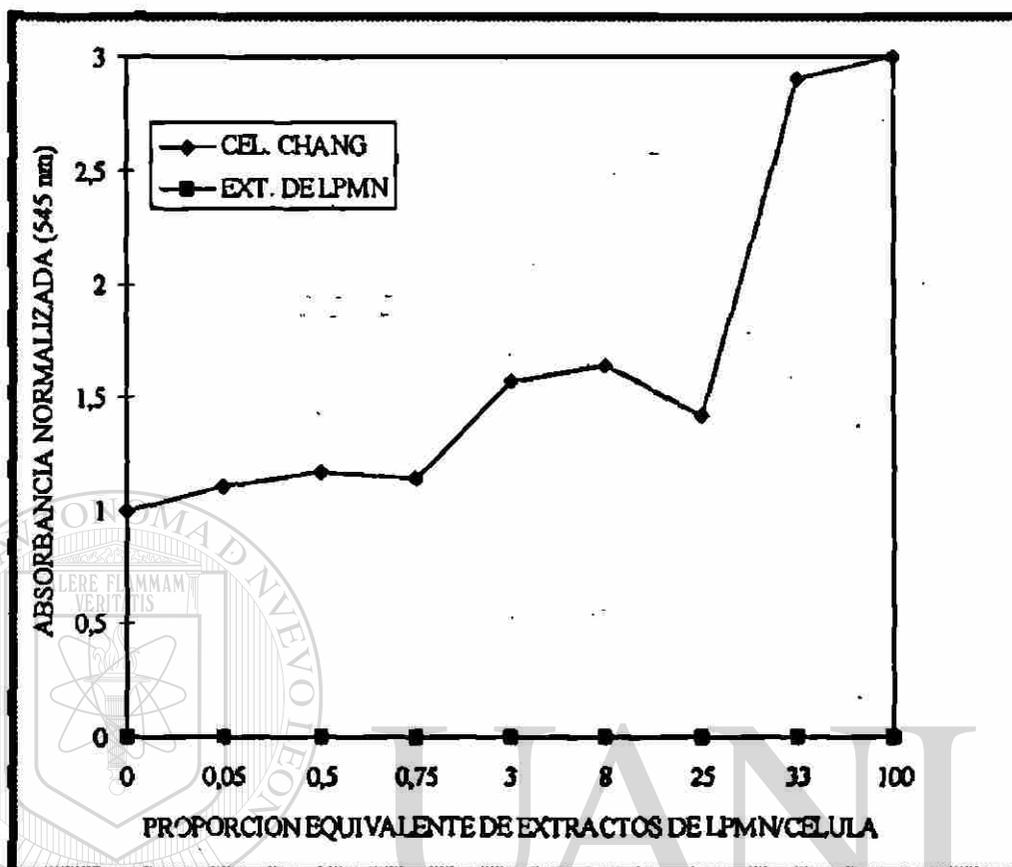


Fig 14. Efecto de concentraciones variables de extractos totales de LPMN sobre células de Chang, utilizando el modelo del MTT en microplacas de 96 pozos.

4.9 Actividad Hemolítica de la Fracción Vesicular Amibiana P30

La fracción P30 produce una hemólisis directamente proporcional a su concentración (Fig. 15). Determinamos la potencia hemolítica de la fracción P30 expresada en UH. Definimos 1 UH como el aumento en 0.05 unidades de absorbancia debida a la liberación de hemoglobina causada por la P30. De tal manera que 1 μg de P30 tiene una potencia hemolítica de 2 UH.

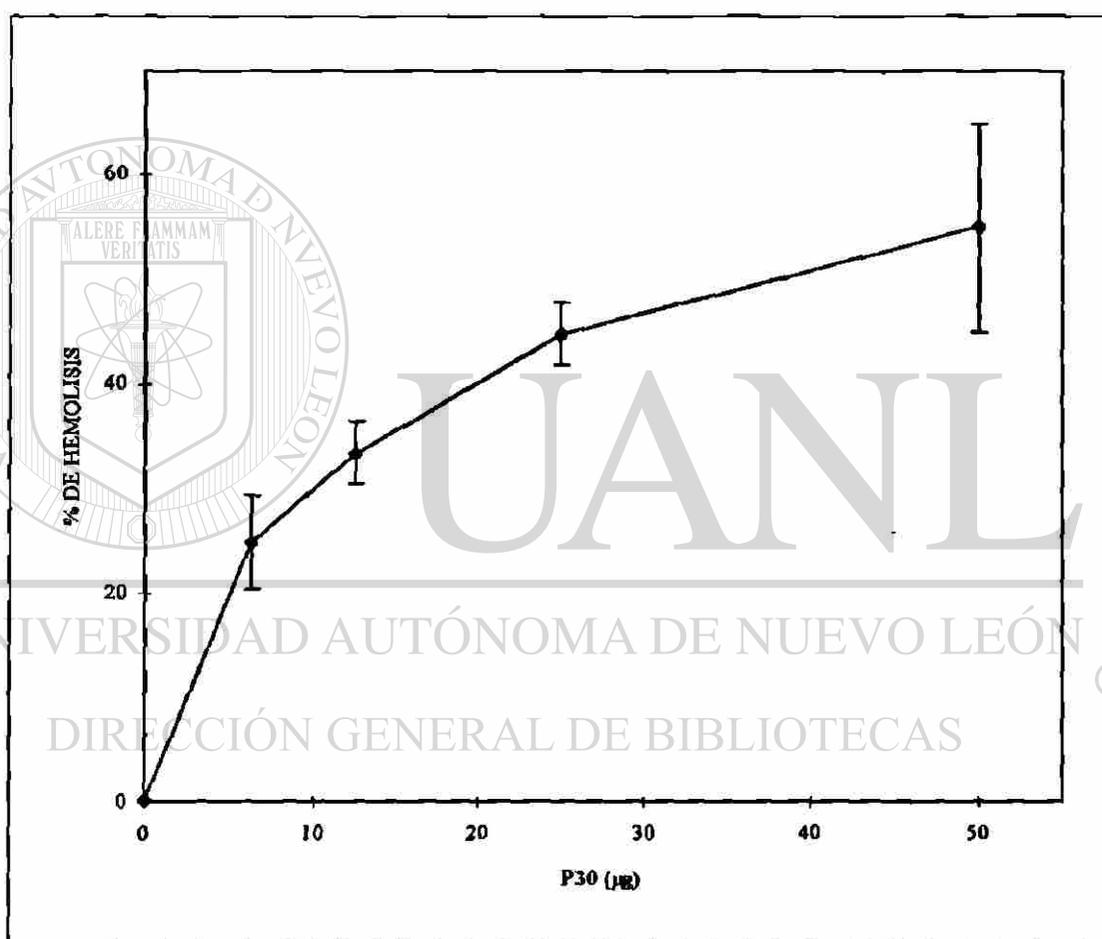


Figura 15. Actividad hemolítica de la fracción P30.. Calculamos la potencia hemolítica en unidades hemolíticas (UH). 100 UH = 50 μg de proteína total. Cada punto corresponde a 3 determinaciones independientes.

4.10 Efecto Citopático de la Fracción Vesicular P30 de *E. histolytica* Sobre Células de Chang

Encontramos que la fracción P30 indujo una activación en el metabolismo de las células de Chang, lo que provocó una mayor reducción del MTT. Esta activación aparentemente fue mayor cuando el efecto fue mediado por LPMN y usando una alta concentración de P30 (Fig. 16).

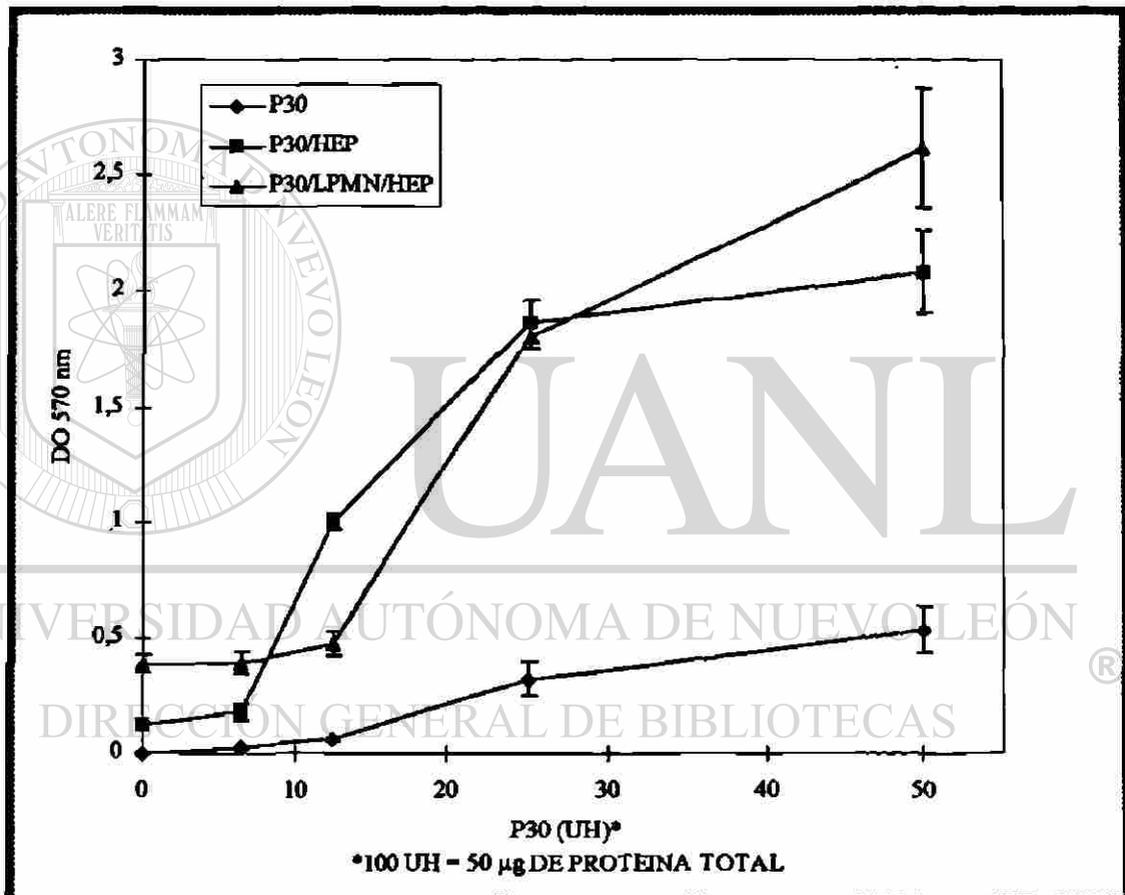


Figura 16. Efecto citopático de la fracción vesicular P30 de *E. histolytica*.

En pozos con 7.5×10^3 células de Chang, añadimos P30 preincubada por 6 h con SSB ó con LPMN e incubamos por 3 h. Como control de la capacidad reductora de P30, la preincubamos en SSB y la añadimos a pozos sin células. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes.

Cuando incubamos 50 μg de P30 (100 UH) con 7.5×10^3 células de Chang, encontramos que produjeron una absorbancia de 2.08 nm, y cuando preincubamos la P30 con LPMN (el mismo número de LPMN que usamos en los experimentos anteriores) y después sobre células de Chang, encontramos que la absorbancia producida por las células de Chang fue de 2.62 nm. Si a estos valores le restamos la absorbancia de 0.54 nm que fue la producida por la P30 únicamente (sin células de Chang) encontramos que el incremento en la capacidad de reducir el MTT por parte de las células de Chang fue de 16 veces cuando usamos P30 preincubada con LPMN, y de 11 veces cuando usamos P30 únicamente, estos valores los calculamos comparándolos con nuestro control de células de Chang incubadas en SSB sin haber estado en contacto con P30 ni LPMN. (Tabla 2).

TABLA 2.

Incremento en la Capacidad de Reducir el MTT de las Células de Chang por Efecto de la Fracción P30.

Componentes del ensayo	DO ₅₇₀	Incremento de la DO ₅₇₀
Células de Chang	0.13 \pm 0.006	-
P30	0.53 \pm 0.002	-
Células de Chang + LPMN	0.39 \pm 0.039	3.1
P30 + Células de Chang	2.08 \pm 0.03	16.4
P30 + Células de Chang + LPMN	2.62 \pm 0.05	20.7

- ◆ El incremento en la DO es con respecto a la encontrada en las células de Chang
- ◆ La dosis de fracción P30 fue de 100 UH (1UH = liberación de hemoglobina equivalente a 0.005 UDO₄₁₅)
- ◆ El número de células de Chang en todos los ensayos fue 7.5×10^3 células/pozo
- ◆ Número de LPMN usado fue 1.5×10^6 por pozo

5. DISCUSION

Una de las características más relevantes del protozoario parásito *E. histolytica*, es su capacidad para destruir tejidos. Varias moléculas con actividad citolítica han sido implicadas en este proceso, pero aún no se conoce el papel que desempeña cada una de éstas en tal mecanismo. En parte, esto se debe a que no se cuenta con el modelo que permita estudiar por separado o en diferentes combinaciones a estos factores.

La principal causa de muerte en la amibiasis invasiva es el absceso hepático amibiano; éste se caracteriza por la destrucción de tejidos en las áreas invadidas por el parásito. Las primeras observaciones hechas en autopsias sugerían una carencia de respuesta celular inmune (c.ref 57), sin embargo en modelos experimentales, usando hámsters y gérbiles, se ha observado que al inocular amibas en el hígado, se produce una reacción inflamatoria aguda. En esta etapa temprana, predomina la presencia de LPMN rodeando a las amibas invasoras y no se observa un contacto directo entre amibas y hepatocitos, aunque el daño al tejido hepático es evidente (57).

En el absceso hepático amibiano, la respuesta granulomatosa es ineficiente para controlar el progreso de la invasión. Los leucocitos no son capaces de lisan a las amibas, sino más bien éstas lisan a los leucocitos. Por lo que se ha propuesto que la destrucción de las células hepáticas se debe principalmente a que los LPMN, que son lisados al acudir a tratar de combatir la infección, liberan su carga enzimática por efecto de las citolisinas de *E. histolytica*, y que estas moléculas liberadas por los LPMN en conjunto con las citolisinas del parásito son en mayor parte las responsables de la destrucción celular (57).

Estudios *in vitro* apoyan estas observaciones. Cuando cultivos de hepatocitos son incubados conjuntamente con LPMN y amibas, el daño celular es mayor que el producido en los hepatocitos sólo por las amibas (56).

Los LPMN poseen un número de mecanismos celulares que son cruciales para el sistema defensivo del hospedero. Ellos producen citocinas y varios prostanooides en respuesta a una infección o alteración en los tejidos (77), además liberan potentes enzimas proteolíticas y generan radicales de oxígeno cuya función es matar microorganismos patogénicos. El mismo mecanismo celular que los LPMN usan para defender contra una invasión bacteriana también produce daño celular y tisular, llevando potencialmente a la disfunción del órgano que ocurre luego de un proceso inflamatorio (78). Estos mismos autores también mostraron que los LPMN activados con myristato-12 acetato-13 de forbol producen daño hepático y este es responsable al menos en buena parte por proteasas, pero no por los radicales oxígeno (78).

Estos estudios sugieren que es posible que en el absceso hepático amibiano este involucrado un proceso similar, donde los LPMN sean activados por factores amibianos aumentando la producción de moléculas tóxicas por parte de los LPMN.

E. histolytica posee varias moléculas implicadas como citolisinas y que son potencialmente capaces de desarrollar un papel importante en su mecanismo patogénico. En nuestro laboratorio se ha trabajado en los últimos años en un grupo de ellas: las fosfolipasas. Las cuales describimos ampliamente en la introducción. En algunas especies patógenas de *Trypanozomas*, *Acanthamoeba* y *Naegleria*, caracterizados por destruir tejidos, se ha determinado actividad fosfolipásica. La fosfolipasa A₂ amibiana, particularmente, posee características que la hacen un posible candidato como factor de virulencia importante para las amibas. La PLA₂ de *E. histolytica* fue purificada, pero es necesario optimizar el proceso de purificación para obtenerla en cantidades suficientes para analizar su papel específico en el proceso citolítico de *E. histolytica*.

La mayor parte de la actividad fosfolipásica amibiana reside en la fracción vesicular P30. Observaciones realizadas por microscopía electrónica muestran que la fracción subcelular P30 está compuesta de vesículas selladas de membrana celular, así como de las vesículas digestivas y lisosomales propias de los trofozoítos (52). En 1980, López Revilla

y Said-Fernández (32) encontraron que en esta fracción reside la mayor actividad hemolítica. Posteriormente se ha demostrado que en ella también reside la mayor actividad tanto citolítica como fosfolipásica. En base a esto decidimos usar en este trabajo la fracción P30 como una fracción enriquecida en PLA₂.

En este trabajo nos propusimos estudiar el efecto de la PLA₂ sobre un cultivo de hepatocitos humanos (Línea de células de Chang) y cómo la presencia de LPMN modifica este efecto. Los datos obtenidos nos darían una imagen del papel de la PLA₂ en el daño hepático observado en el absceso amibiano y como las células inmunes están involucradas en el proceso.

Obtuvimos la P30 de los cultivos amibianos por homogeneización mecánica, tratando de evitar métodos como la sonicación o ciclos de congelación descongelación, con el fin de evitar en lo mas posible la desnaturalización de las proteínas. Para estudiar el efecto que tiene una fosfolipasa pura en nuestro modelo, elegimos la PLA₂ de veneno de cobra (*N. mocambique*) por ser una PLA₂ bien caracterizada y con efecto citolítico comprobado.

Para llevar a cabo nuestros objetivos, adecuamos un modelo que nos permitiera determinar cuantitativamente el efecto citolítico sobre hepatocitos humanos. Implementamos un método colorimétrico basado en la reducción de una sal de tetrazolio (MTT) por deshidrogenasas mitocondriales en células vivas. Las células muertas pierden la capacidad de reducir el MTT.

La reducción del MTT por las células vivas producen cristales de formazán insolubles en agua, que luego de retirar todo el MTT que no fue reducido, es disuelto en isopropanol acidificado. El formazán es un compuesto coloreado medible espectrofotométricamente. El desarrollo del color está directamente relacionado con el número de células vivas en el cultivo. Lo cual nos permite calcular el porcentaje de células muertas por efecto de un agente lítico; comparando la absorbancia producida

después de la interacción entre el agente lítico y las células en cultivo con la absorbancia producida por un control sin agente lítico. En nuestro modelo agregamos un acarreador de electrones, PMS, para catalizar la reducción del MTT y disminuir el tiempo de incubación.

Para la estandarización del método en nuestras condiciones, determinamos el tiempo de incubación en el cual la reacción de reducción del MTT llega a su máximo en monocapas de células de Chang en microplacas de 96 pozos. En nuestras condiciones la reducción se llevó a cabo en 75 min. Tiempos mayores no produjeron mayor reducción del MTT. La ventaja de usar PMS es el menor tiempo de incubación que se necesita para la reducción del MTT en comparación de las 4-6 h promedio reportado por otros autores cuando solo se usa MTT (65-68).

La longitud de onda a la cual el formazán tiene su máxima absorción disuelto en isopropanol acidificado está entre 540 y 570 nm. Algunos autores han usado diferentes longitudes de onda (desde 450 hasta 650 nm) para determinar la densidad óptica del formazán formado. Nosotros logramos una buena solubilización con el isopropanol y determinamos que a 545 nm y usando una longitud de onda de referencia de 630 nm, logramos la máxima absorbancia en nuestro modelo.

Probamos si nuestro modelo era útil para nuestros propósitos de dos maneras: 1) determinamos los valores de absorbancia dados por cultivos con diferente densidad celular. Encontramos una relación directa y lineal entre el número de células en cultivo y los valores de absorbancia. Esto nos aseguraba que el modelo era capaz de cuantificar las diferencias entre los cultivos con diferente densidad celular. 2) Para analizar si el modelo podría cuantificar la muerte celular por efecto de un agente lítico, determinamos los valores de absorbancia en monocapas de hepatocitos tratadas con diferentes concentraciones de tritón X-100. Encontramos que con este modelo podíamos cuantificar la muerte celular de los cultivos al encontrar una dependencia de la

disminución de la absorbancia, equivalente a un incremento de la muerte celular, con el aumento de la concentración de tritón X-100.

Teniendo nuestro modelo desarrollado y estandarizado procedimos a poner a prueba la hipótesis de nuestro trabajo: que el daño de hepatocitos es mediado por LPMN por efecto de citolisinas, en este caso la PLA₂ de veneno de cobra y la fracción amibiana P30.

Determinamos la potencia hemolítica de nuestra preparación de PLA₂ de *N. mocambique* y de P30 para tener un parámetro de referencia al hacer los posteriores ensayos de citólisis. Tanto la PLA₂ de *N. mocambique* como la P30 lisaron eritrocitos de rata en relación directa con su concentración. Calculamos su DH₅₀ correspondiente y la aumentamos 10 veces para realizar los ensayos citolíticos, considerando que las células nucleadas tienen una mayor capacidad para resistir el reto con agentes líticos que los eritrocitos.

La PLA₂ de *N. mocambique* tiene un efecto citolítico dependiente de la dosis sobre las células de Chang. Este efecto se ve aumentado cuando preincubamos la PLA₂ con LPMN por 6 h previas al contacto con las células de Chang. Las fosfolipasas actúan primariamente sobre los fosfolípidos de las membranas plasmáticas produciendo ácidos grasos y fosfolisoderivados. Ambos productos son líticos y se acumulan, además de que potencian la acción de las fosfolipasas. Con el fin de descartar que el aumento en la actividad citolítica se debiera al efecto de estos subproductos más que por la inducción y liberación de productos líticos de los LPMN, preincubamos la PLA₂ con eritrocitos de rata. Debido a la relativa sencillez enzimática de los eritrocitos, prácticamente lo que proporcionaron al sistema fue la membrana (sustrato). El número de eritrocitos usados fue determinado por la cantidad de ellos que igualaran la superficie de membrana proporcionada por los LPMN usados en el ensayo como un sustrato para la actividad de la PLA₂. Cuando preincubamos la PLA₂ con eritrocitos humanos la actividad citolítica prácticamente se anuló, pues con la dosis más alta de PLA₂ sólo produjo 4.6% de muerte en comparación de un 32% producido por la PLA₂ sola. En cambio cuando preincubamos con LPMN, la actividad citolítica fue de 53%. Lo que representa 1.7 veces

más que el efecto producido por la PLA₂ sola y 11.5 veces más de lo producido por la PLA₂ preincubada con eritrocitos. Con esto confirmamos que el aumento de la actividad citolítica se debe a productos liberados de los LPMN por efecto de la PLA₂. Es decir una fosfolipasa pura es capaz de inducir la producción y liberación de productos líticos de los LPMN que median la muerte de hepatocitos.

La P30 es una fracción compleja, donde se ha mostrado que residen mayormente las actividades hemolítica, citolítica y fosfolipásica de *E. histolytica*. Contrario a lo que esperabamos no observamos muerte de las células de Chang en los tiempos de incubación y con las concentraciones de P30 usadas. Lo que encontramos fue un incremento en la reducción del MTT por efecto de la P30 sobre las células de Chang. Lo que podría deberse a la estimulación de las deshidrogenasas mitocondriales de las células de Chang. Las células de Chang incubadas con P30 redujeron mucho más activamente el MTT que nuestros controles. Esto sugiere que alguna (s) moléculas amibianas son capaces de inducir cambios metabólicos sobre diversos tipos de células, posiblemente mediado por receptores de membrana o de moléculas internalizadas por las células blanco. Este efecto parece ser poco específico.

Said-Fernández y López-Revilla, reportaron anteriormente que los extractos amibianos son capaces de inducir la síntesis de DNA en células CHO (79). No sabemos si este efecto en la activación de las enzimas mitocondriales sea sólo un reflejo de una activación total del metabolismo celular y si este incremento en la actividad celular sea un paso inicial de procesos degenerativos celulares que lleven a su muerte provocados por efecto de productos amibianos. Si los LPMN y otras células del sistema inmune responden en forma similar, este efecto podría influir en la respuesta inmune celular al aumentar la producción de moléculas líticas. Esto favorecería el mecanismo citolítico de las amibas mediado por LPMN, sugerido por otros investigadores y apoyado por el presente trabajo.

Será necesario aislar y purificar moléculas específicas y estudiar por separado su efecto en modelos adecuados que respondan a estas preguntas.

5.1 CONCLUSIONES

Implementamos el método del MTT, el cual es un modelo sencillo y reproducible para determinar y cuantificar el efecto de agentes citolíticos.

Con este modelo encontramos que la presencia de LPMN incrementa el daño citoletal producido por la PLA₂ de veneno de cobra (*N. mocambique*) sobre hepatocitos en cultivo y que éste efecto se debe a productos liberados de los LPMN por acción de la PLA₂ de veneno de cobra.

En nuestras condiciones de ensayo, la fracción amibiana P30 lisó eritrocitos de rata, pero no a las células de Chang. Sin embargo P30 incremento la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales de las células de Chang sin lisarlas.

Este efecto de la P30 de incrementar la capacidad de las células de Chang para reducir el MTT se vió aparentemente incrementado con la presencia de LPMN.

A diferencia de lo que se ha reportado en otras células P30, un extracto subcelular conserva la capacidad de reducir el MTT

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.2 PERSPECTIVAS

En proyectos paralelos de nuestro grupo se esta tratando de aislar clonas de una biblioteca de ADNc de *E. histolytica*, con secuencias que codifiquen para PLA₂ amibianas.

Por otro lado se esta perfeccionando un método para aislar mayores cantidades de PLA₂ de cultivos amibianos. Uno o ambos proyectos permitirán disponer de suficiente cantidad de PLA₂ para investigar si estas enzimas tienen el mismo efecto que la PLA₂ de cobra, probada en este trabajo.

Los datos que hemos referido en la discusión sugieren que las amibas podrian inducir una “explosión metabólica” en diversos tipos de células entre las que podrian estar incluidos los LPMN y macrófagos. Si esto fuera así y también se indujera la producción de enzimas hidrolíticas, podría formarse una cascada de liberación de productos hidrolíticos multiplicando el efecto citolítico inicial de las citolisinas amibianas. Sin embargo será necesario demostrar, en una forma directa que las deshidrogenasas de las células de Chang son estimuladas por P30 y después será de gran importancia identificar y aislar los factores amibianos responsables. Nos proponemos investigar esta posibilidad.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6. REFERENCIAS

1. Walsh, J.A. Problems and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Reviews of infectious Diseases*; 8:228-238 1986.
2. Elsom-Dew, R. The epidemiology of amebiasis. *Advances in Parasitology*; 6:1-62 1968.
3. Treviño, García-Manzo N., Escandon-Romero C., Escobedo de la Peña J., Hernández-Ramos J.M., Fierro- Hernández H. Amebiasis in the epidemiologic transition in México: Its morbidity and mortality trends in the Mexican Institute of Social Security *Arch Invest Méd (Méx.)*; 25:393-399, 1994.
4. Kretschmer, R., Amibiasis: Infección y Enfermedad por *Entamoeba histolytica*, 1a ed. Ed. Trillas, S. A. de C. V., 209-225, 1994
5. Kumate, J., Gutiérrez, G., Manual de infectología, 7a. edición, Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. México, 56-65, 1980.
6. Mirelman, D., Ameba-bacterium relationship in amebiasis. *Microbiological Reviews*; 51:272-284.
7. Said-Fernández S., Vargas-Villarreal J., Castro-Garza J. Mecanismo multifactorial de la actividad citolítica de *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Méd (Méx.)*; 17(Supl.1): 173-178, 1986.
8. Gitler C., Mirelman D. Factors contributing to the pathogenic behavior of *Entamoeba histolytica*. *Ann Rev Microbiol*; 40:237-261, 1986.
9. Said-Fernández, S., López-Revilla, R. Actividad citopatogénica en extractos de trofozoítos de *E. histolytica*, *Arch Invest Méd*; 9:155-156, 1978.

10. Ravdin J.I. *Entamoeba histolytica*: from adherence to enteropathy. *J Infect Dis*; 159:420-429. 1989.
11. Rodríguez M.A., Hernández F., Santos L., Váldez A., Orozco E. *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell- parasite relationship. *Mol Biochem Parasitol*; 37:87-100. 1989.
12. Rosales-Encina J.L., Meza I., López-DeLeón A., Talamás-Rohana P., Rojkind M. Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis*; 156:790-797, 1987.
13. Ravdin J.I., Jackson T.F.G.H., Petri W.A. y col.. Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis*; 162:768-772, 1990.
14. Ravdin J.I., Croft B.Y., Guerrant R.L. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*; 152:377-390,1980.
-
15. Ravdin J.I., Guerrant R.L. A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. *Rev Infect Dis*; 4:1185-1207,1982. ®
16. Orozco E., Guarneros G., Martínez-Palomo A., Sánchez T. *Entamoeba histolytica*: Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med*; 158:1511-1521,1983.
17. Leitch G.J., Dickey A.D., Udezulu I.A., Biley G.B. *Entamoeba histolytica* trophozoites in the lumen and mucus blanket of rat colons studied in vivo. *Infect Immun*; 47:68, 1985.
18. Ravdin J.I., John J.E., Johnston L.I., Innes D.J., Guerrant R.L. Adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to rat and human colonic mucosa. *Infect Immun*; 48:292-297, 1985.

19. Mattern C.F.T., Keister A.B., Casper P.A. Experimental amebiasis. III A *rapid in vitro* assay for virulence of *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg*; 27:882-887, 1978.
20. Udezulu I.A., Leitch G.J. A membrane-associated neuraminidase in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Immun*; 55:181-186, 1987.
21. Talamás-Rohana P., Meza I. Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. *J Cell Biol*; 106:1787-1794, 1988.
22. Muñoz M.D.I., Calderón J., Rojkind M. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*; 155:42-51, 1982.
23. Gadasi H., Kessler E. Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun*; 39:528-531, 1983.
24. McLaughlin J., Faubert G. Partial purification and some properties of neutral sulfhydryl and acid proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Can J Microbiol*; 23:420-425, 1977.
25. Magauda P.L., Pennisi L. Lisosomi e protozoi: Rassegna sulle idrolasi acide, dimostrate per via citochimica, nei protozoi e specificatamente in alcune specie di *Entamoeba*. *Rev Parassitol*; 30:133-146, 1969.
26. Gadasi H., Kobiler D. *Entamoeba histolytica*: Correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Exp Parasitol*; 55:105-110, 1983.
27. Scholze H., Werries E. A weakly protease has a powerful proteolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*; 11:293-300, 1984.

28. Bos H.J. *Entamoeba histolytica*: Cytopathogenicity of intact amebae and cell-free extract; isolation and characterization of an intracellular toxin. *Exp Parasitol*; 47:369-377, 1979.
29. Lushbaugh W.D., Kairalla A.B., Cantey J.R., Hofbauer A.F., Pittman F.E. Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis*; 139:9-17, 1979.
30. Said-Fernández S. Factores de virulencia de *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Méd (Méx)*; 21:253-262, 1990.
31. Lopez-Revilla J., Said-Fernández S. Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: Hemolytic activity of trophozoite homogenates. *Am J Trop Med Hyg*; 29:209-212, 1980.
32. Orozco, E., Martínez-Palomo, A., López-revilla, R., Un modelo *in vitro* para el estudio cuantitativo de la virulencia de *E. histolytica*. *Arch Invest Méd (Méx)*; 9:257-260, 1978.
-
33. Martínez-Palomo, A., González-Robles, A., Chávez, B., Orozco, E., Fernández-Castelo, S., Cervantes, A., Structural bases of the cytolytic mechanisms of *E. histolytica*, *J Protozool*; 32:166, 1985.
34. Petri, W.A., Jr., Ravdin J.I., In vitro models of amebic pathogenesis. In amebiasis. Human infection by *E. histolytica*, J. I. Ravdin (Ed) John Wiley & Sons, New York, 191-204, 1988.
35. Mirelman, D., Chayenn A., Interaction of amebas with cells. In amebiasis: Infection and disease by *E. histolytica*, R.R. Kretschmer (Ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida, 159-172, 1990.

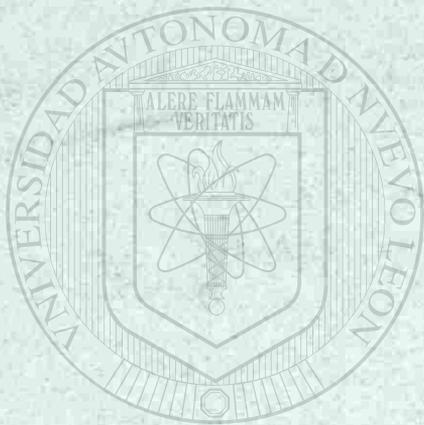
36. Petri, W.A., Jr., Ravdin J.I., Cytopathogenicity of *E. histolytica*: the role of amebic adherence and contact-dependent cytolysis in pathogenesis. *Eu J Epidemiology*, 3:123-136, 1987.
37. Ravdin, J.I., Guerrant, Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *E. histolytica*. *J Clin Inv*; 68:1305-1313, 1981.
38. Bos, H.J., W.J., Leijendekker, Van den Eijk, A., *E. histolytica*: cytopathogenicity, including serum effects on contact-dependent and toxin-induced lysis of hamster kidney cell monolayers. *Experimental Parasitology*; 50: 342-348, 1980.
39. Vargas-Villarreal J., Said-Fernández S. *Entamoeba histolytica*: Cytolytic activity of cell-free trophozoite extract upon CHO cells. *Arch Invest Med (Méx)*; 15:1-12, 1984.
40. Castro-Garza J.E. Detección de una citolisina de efecto inmediato en extractos de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. Desarrollo de un modelo experimental. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, 1986.
-
41. Thelestam, M., Möllby, R. Classification of microbial, plant and animal cytolysins based on their membrane damaging effects on human fibroblast. *Biochem Biophys Acta*; 557:156-169, 1979.
42. Long-Krug S.A., Fischer K.J., Hysmith R.M., Ravdin J.I. Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. *J Infect Dis*; 152:536-541, 1985.
43. Ravdin J.I., Murphy C.F., Guerrant R.L., Long-Krug S.A. Effect of antagonist of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Infec Dis*; 152:542-549, 1985.

44. McCaul T.F., Poston R.N., Bird R.G. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Chromium release from labeled human liver cells in culture. *Exp Parasitol*; 43:342-352, 1977.
45. Ding, J.E.Y., Zanvil, A.C., Molecular mechanisms of cytotoxicity mediated by *E. histolytica*: Characterization of a pore-forming protein (PFP). *J Cell Biochem*, 29:299-308, 1985.
46. Gitler, C., Mogyoros, M. Calef, E., Rosenberg, I., Lethal recognition between *E. histolytica* and the host tissues, *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 79:581-586, 1985.
47. Avila, E.E., Sanches, M.G., Calderón, J., *E. histolytica* and *E. invadens*: sulfhydryl-dependent proteolytic activity, *J Protozool*; 32:163-175, 1985.
48. Ostoa, P.S., Cabrera, N., Becker, I., Pérez-Montfort, R., Proteinases of *E. histolytica* associated with different subcellular fractions. *Mol Biochem Parasitology*; 32:133-144, 1989.
-
49. Rosales-Encina, J.L., Schlie-Gúzman, M.A., Jimenez-Delgadillo B., Talamás-Rohana, P., Rojkind-Matluk, M., Purification and partial characterization of an hemolytic activity from *E. histolytica*. *Arch Invest Méd (Méx)*; 23:243-248, 1992.
50. Rosenthal, A., F., Beyer, R.P., A synthetic inhibitor of venom lecithinase A. *J Biol Chem*; 235: 2202-2206, 1968.
51. Vargas-Villarreal, J., Martínez-Rodríguez, H., Castro-Garza, J., Mata-Cárdenas, B., González-Garza, M.T., Said Fernández, S., Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and lysophospholipase L₁ activities. *Parasitol Res*; 81:320-323, 1995.

52. Said-Fernández, S. y López-Revilla, R. Subcellular distribution and stability of the major hemolytic activity of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Zeitschrift Für Parasitenkunde*; 67:249-254. 1982.
53. Said-Fernández, S., López-Revilla, R., Free fatty acids released from phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infection and Immunity*; 56:874-879, 1988.
54. Montfort I., Pérez-Tamayo R., González Canto A., García de León M.C., Olivos A., Tello E. Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes *in vitro*. *J Parasitol*; 79:98-105, 1993.
55. Salata R.A., Ravdin J.I. The interaction of human neutrophils and *Entamoeba histolytica* increases cytopathogenicity for liver cell monolayers. *J Infect Dis*; 154:19-26, 1986.
56. Tsutsumi V., Mena-López R., Anaya-Velázquez F., Martínez-Palomo A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol*; 117:81-91, 1984.
57. Chadee K., Meerovitch E. The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the Gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Am J Pathol*; 117:71-80, 1984.
58. Chadee K., Meerovitch E. *Entamoeba histolytica*: Early progressive pathology in the cecum of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Am J Trop Med Hyg*; 34:283-291, 1985.
59. Brandt H., Pérez-Tamayo R. Amibiasis. México: La Prensa Médica Mexicana; 1-91, 1970.

60. Guerrant RL., Brush J., Ravdin JL., Sullivan JA., Mandell GL. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis*; 143:83-93, 1981.
61. Jarumilinta R., Kradofler F. The toxic effect of *Entamoeba histolytica* on leukocytes. *Ann Trop Med Parasitol*; 58: 375-381, 1964.
62. Tsutsumi V., Martínez-Palomo A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis: an ultrastructural study. *Am J Pathol*; 130:112-119, 1988.
63. Daniel, P. Stites; John D. Stobo; H. Hugh, Fudenberg; J. Vivian Wells, *Inmunología Básica y Clínica* 4a. ed. El manual moderno, México; 221-228, 1983.
64. Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*; 65:55, 1983.
65. Slater T.F., Sawyer, B., Strauli, U., Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta*; 77:383-393, 1963.
66. Cedillo-Rivera, R., Ramírez, A. Muñoz, O., A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *E. histolytica*, *Arch Invest Med*, 23:59-61, 1992.
67. Siedlar, M., Uracz, W., Zembala, M., Augmentation of monocyte-mediated cytotoxic activity by a low dose tumour necrosis factor measured by the kinetic colorimetric microplate assay. *Immunology Letters*; 34:249-256, 1992.
68. Chang R.S. Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. *Proc Soc Exp Biol Med*; 87:440- 443, 1954.

69. Bøyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Invest; 21(Suppl 97):77, 1965.
70. Isolation of Blood Cells booklet. 3rd edition. Nycomed Pharma, Norway, 1992.
71. Cell Biology Booklet. Fourth edition. Nycomed Pharma, Norway, 1992.
72. Said-Fernández S., Vargas-Villarreal J., Castro-Garza J. y col. PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Trans R Soc Trop Med Hyg; 82:249-253, 1988.
73. Mata-Cárdenas B.D., Said-Fernández S. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* in suspension. Trans R Soc Trop Med Hyg; 86:173-174, 1992.
74. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.S., Farr, A.L. y Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J Biol Chem. 183:265-275, 1951.
75. Zar J.H. Biostatistical Analysis. U.S.A.: Prentice-Hall, Inc.:198-251, 1974.
-
76. Jian X. Zhang, Donald V. Jones, and Mark G. Clemens. Effect of activation on neutrophil-induced hepatic microvascular injury in isolated rat liver. Shock, 1:273-278, 1994.
77. Harbrecht, B.G., Billiar, T.R., Curran, R.D., Stadler, J., and Simmons, R.L. Hepatocyte injury by activated neutrophils *in vitro* is mediated by proteases. Annals of Surgery; 218:120-128 1993.
78. Said-Fernández, S. y López-Revilla, R., Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: trophozoite homogenates modulate DNA synthesis in a mammalian cell line., rev. 2. Parasitenkunde, vol. 65,11-17, Alemania, 1981.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

