

1984-2

REG. No. 077488839

---

---

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS



FAGOCITOSIS Y DEGRADACION DE ERITROCITOS  
HUMANOS POR Entamoeba invadens.

---

---

JOSE DE JESUS RAMIREZ CORDOVA

---

---

FAGOCITOSIS Y DEGRADACION DE ERITROCITOS

HUMANOS POR Entamoeba invadens

JOSE DE JESUS RAMIREZ CORDOVA

**DIRECTOR DE TESIS:**

**M. en C. JUAN MORA GALINDO**

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la División de Biología del Desarrollo de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de Occidente del I.M.S.S. Bajo la dirección del M.en C. Juan Mora Galindo.

La investigación fue apoyada por el CONACYT en su programa de Becas Tesis de Licenciatura

## I N D I C E

1. INTRODUCCION	5
2. JUSTIFICACION	6
3. ANTECEDENTES	7
4. HIPOTESIS	15
5. OBJETIVO	16
6. MATERIALES Y METODOS	17
7. RESULTADOS	21
8. DISCUSION	35
9. CONCLUSIONES	39
10. BIBLIOGRAFIA	40
11. CARTA DE ACEPTACION DE TEMA	46
12. CARTA DEL Vo. Bo. DEL DIRECTOR DE TESIS	47

## INTRODUCCION

Entamoeba invadens es una especie de amibas parásita de reptiles que fué descubierta en 1936; está estrechamente relacionada con Entamoeba histolytica y presenta varias características que se pueden aprovechar para realizar estudios de laboratorio como son su facilidad para mantenerlas en cultivo por largo tiempo y el amplio rango de temperatura en la cual crecen y se reproducen.

En el presente trabajo se estudió a E. invadens independientemente de su posición filogenética y su naturaleza patógena.

Ya que no existen trabajos relacionados sobre los procesos digestivos de E. invadens, este estudio ampliará la información sobre la Biología del genero Entamoeba.

## JUSTIFICACION

El estudio de los procesos digestivos de E. invadens es importante por el desconocimiento que se tiene de los factores que determinan la patogenicidad de esta especie de amibas.

## ANTECEDENTES

En 1933 Ratcliffe y Geiman (1) describieron una enfermedad en reptiles comparable con la amibiasis del hombre y además determinaron que la enfermedad estuvo asociada con una especie de Entamoeba estrechamente relacionada a Entamoeba histolytica.

Rodhain (1934) describió una infección en reptiles que morían en cautiverio, asociada a un tipo de Entamoeba y a este organismo asignó el nombre de Entamoeba invadens(2). Geiman y Ratcliffe (3) después de un detallado estudio del organismo que aislaron de reptiles infectados, concluyeron que era distinta de E. histolytica y la identificaron como E. invadens ya que fue idéntica a la encontrada por Rodhain.

### TAXONOMIA DE E. invadens

- Phylum - Protozoa
- Subphylum - Plasmodroma
- Clase 2 - Sarcodina
- Subclase 1- Rhizopoda
- Orden 3 - Amoebidae
- Familia 3 - Endamoebidae

La familia Endamoebidae esta constituida por amibas parásitas y comensales; los trofozoítos son relativamente pequeños y viven en el tubo digestivo de varios animales huéspedes, se multiplican por fisión binaria y el enquistamiento es común. La diferenciación generica esta basada en las características nucleares(4).



Se han descrito 8 generos dentro de la familia Endamoebidae:

- 1) Endamoeba (Leidy 1879)
- 2) Entamoeba (Cassagendri 1895)
- 3) Iodamoeba (Dobell 1919)
- 4) Endolimax (Kuenen 1913)
- 5) Dientamoeba (Jepps 1918)
- 6) Martinezia (Hegner 1926)
- 7) Dobelina (Bishop 1939)
- 8) Hydramoeba (Reynolds 1928)

Dentro del genero Entamoeba 4 son las especies mas conocidas:

- 1) Entamoeba histolytica (Schaudinn 1903)
- 2) Entamoeba coli (Grassi 1919)
- 3) Entamoeba gingivalis (Gros 1849)
- 4) Entamoeba invadens (Rodhain 1934)

#### BIOLOGIA CELULAR DE Entamoeba invadens

El trofozoito es la fase móvil de E. invadens; es una célula altamente dinámica y pleomorfica, cuya forma y motilidad son sensibles a cambios en el medio ambiente. Temperaturas abajo de los 20°C producen aletargamiento; las amibas se vuelven esféricas y se separan del sustrato, mientras que aquellas que producen agregados tienden a disgregarse.

El pleomorfismo de los trofozoitos de E. histolytica es evidente cuando se examinan con microscopía electronica de barrido, en ellos se distinguen varios lobopodos y una zona llamada uroide, que apa-

rece como coia, la maybría de la superficie celular es arrugada con aberturas circulares que corresponden a vesículas macro y micro-pinocíticas(5). Esta descripción se aplica a E.invadens.

En E.histolytica, existe una clara distinción entre ectoplasma y endoplasma en los canales fagocíticos, en los que el ectoplasma aparece como una región de material fibrogranular, de mas baja densidad que el endoplasma (6). La organización submicroscópica del citoplasma de E.invadens se caracteriza por la ausencia de organelos diferenciados presentes en células eucariotas tales como: retículo endoplásmico, complejo de Golgi, mitocondrias y centriolos (7). Además los ribosomas libres son difíciles de identificar con el microscopio electrónico. En trofozoítos los ribosomas aparecen como arreglos helicoidales, mientras que en quistes se encuentran en forma de inclusiones cristalinas que constituyen el cuerpo cromatoide; se ha encontrado que el cuerpo cromatoide esta compuesto principalmente por ribonucleoproteina (8). Además los ribosomas poseén una velocidad de sedimentación igual a la de otras células eucariotas.

Poco se sabe sobre la organización estructural y bioquímica del citoesqueleto de las amibas del genero Entamoeba; en E.histolytica se han identificado microfilamentos abajo de la membrana, en los sitios de adhesión al sustrato(9). Existen evidencias que sugieren que estan compuestos de actina (10,11). Probablemente los trofozoítos de E.invadens posean estos microfilamentos.

Microtubulos similares a los encontrados en células eucariotas han sido detectados durante la diferenciación de E. invadens (12). Keller, (13) obtuvo evidencias indirectas que sugieren la presencia de tubulina en quistes de E. invadens y menciona la posible participación de ellos en la formación de los cuerpos cromatoides.

La membrana plasmática de E. invadens presenta la clásica unidad de membrana y esta revestida por una cubierta de superficie formada por carbohidratos. En E. histolytica la cubierta es de particular interés porque contiene antígenos amebicos y es apreciable cuando se tiñe con rojo de rutenio, dicha cubierta esta formada por filamentos uniformemente distribuidos en la superficie (14).

Los trofozoítos de E. invadens presentan un nucleo que mide de 4-7  $\mu\text{m}$ . de diametro. Los agregados de cromatina son usualmente uniformes en tamaño y uniformemente distribuidos dentro de la membrana nuclear. El cariosoma o endosoma es una pequeña masa esférica de aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$ . de diámetro, localizado en la parte central del nucleo y es el sitio donde se localiza el DNA mientras que la llamada "cromatina periférica"; aunque estructuralmente diferente a los nucleolos puede funcionalmente compararse a los nucleolos de eucariotas (15).

La división de la ameba es por fisión binaria y procede sin disolución de la membrana nuclear y sin formación de cromosomas visibles (16). El ciclo completo de E. invadens consiste de 4 estados consecutivos llamados: trofozoíto, prequiste, quiste y metaquiste (16). El quiste es la fase responsable de la diseminación del parásito y en consecuencia de la enfermedad: El enquistamiento ma-

sivo de E. invadens se puede inducir en medio axénico (17), los quistes son esféricos, inmóviles, refringentes y están cubiertos por una pared de quitina (18), que mide en promedio 100 nm. de espesor (19).

## METABOLISMO

El medio ambiente en el que se desarrollan las amibas del género *Entamoeba* es esencialmente anaerobio y requiere un bajo potencial redox para su crecimiento óptimo en cultivo, sin embargo las amibas pueden consumir oxígeno (20).

*E. invadens* requiere para su crecimiento carbohidratos como la glucosa o polímeros de ella. La captura de glucosa está mediada por un sistema de transporte específico (21). El catabolismo difiere de la mayoría de los eucariotas, ya que no están presentes mitocondrias, citocromos y ciclo del ácido cítrico. Los productos finales son bioxido de carbono, acetato y etanol; sin embargo la producción de etanol anaerobicamente sobrepasa al acetato 3:1, mientras que aerobíamente la relación es inversa. Se ha demostrado que la glucólisis amebica tiene los mismos intermediarios que la glucólisis clásica, pero que las enzimas son diferentes y el pirofosfato inorgánico es utilizado como una fuente de energía (20).

Harlow (22), ha encontrado una transhidrogenasa asociada con la NADPH diaforasa que provee un medio anaerobico de oxidación del NADH, diferente del sistema encontrado en mitocondrias.

## PATOGENICIDAD

El termino patogenicidad es usado para denotar la habilidad general de un organismo para producir enfermedad, mientras que virulencia se refiere al grado de aquella habilidad pero bajo ciertas condiciones específicas.

Una de las preguntas fundamentales de la biología de E. histolytica y E. invadens se refiere a los factores que determinan la virulencia del parásito. La iniciación de la amibiasis resulta de la ruptura del equilibrio huesped-parásito que es mantenido mientras estos parásitos son restringidos a su fase comensal. La actividad patógena de la amiba ha sido dividida en 4 estados: adhesión, citolisis dependiente de contacto, fagocitosis y degradación (23).

E. histolytica y E. invadens se adhieren a una gran variedad de células; aunque los trofozoítos probablemente no se adhieren durante su fase comensal. Estudios recientes utilizando el ciego del cobayo, demuestran que una interferencia con la adhesión bloquea la actividad citotóxica de la amiba, esta interferencia es mediada principalmente por bacterias (Mora-Galindo y Gonzalez Robles datos no publicados).

El efecto citopático de la amiba no puede ser atribuido a una simple acción, sino a el efecto combinado de varios mecanismos químicos y mecánicos. En la amibiasis invasora estos parásitos fagocitan pequeñas porciones de la periferia de las células blancas, acciones que provocan el rompimiento de la membrana plasmática y que resulta en la ruptura de la célula y la subsecuente lisis celular (23). Por otra parte se ha demostrado que en sonificados de E. invadens contienen componentes tóxicos para eritrocitos de hamster y ratón (24).

Mc. Coonachie (25), observó que E. invadens no ingiere eritrocitos de reptiles, rana y pollo "in vitro", pero los eritrocitos de rata si fueron fagocitados, aunque en pequeñas cantidades comparadas con las altas tasas de fagocitosis de E. histolytica. Posteriormente Trissl y col. (33) demostraron que E. invadens es capaz de fagocitar eritrocitos humanos.

La maquinaria degradativa de E. invadens y E. histolytica es una compleja gama de enzimas hidrolíticas localizadas en los fagolisosomas, pueden encontrarse unidas a la membrana de las vacuolas o en forma soluble. En E. histolytica ha sido detectada actividad de fosfatasa ácida en la membrana de los fagolisosomas (26) en los filopodios y en los bordes de las amibas (27).

Se han identificado diversas actividades enzimáticas tanto en E. invadens como en E. histolytica. Kobayashi y Takeuchi (28) detectaron sobre la membrana plasmática una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  y sobre la superficie interna de la mayoría de las vacuolas, además estos autores identificaron ADPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , tiamino pirofosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  y fosfatasa ácida dentro de las vacuolas.

La velocidad digestiva de E. histolytica sobre células intestinales in vitro ha sido determinada por Chevez y Sepulveda (29), quienes reportan que entre 10 y 30 minutos, los trofozoítos digieren hasta la desintegración y casi desaparición las células intestinales. Sin embargo no existen datos sobre la velocidad de degradación de material fagocitado por E. invadens.

En resumen la acción patógena tanto de E. invadens como de E. histolytica se logra por la combinación de factores químicos y mecánicos. La lisis celular producidas por toxinas o por fagocitosis de una porción de la membrana, es seguida por la ingestión de los restos celulares por medio de fagocitosis y finalmente la degradación de la célula dentro de los fagolisosomas.

## HIPOTESIS

Los trofozoitos de Entamoeba invadens son capaces de degradar eritrocitos humanos.



...  
...  
...  
...  
...

**OBJETIVO**

**El objetivo de este trabajo fué determinar la capacidad fagocítica y degradativa de eritrocitos humanos por Entamoeba invadens**

## MATERIALES Y METODOS

### CEPA Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se utilizó la cepa IP-1 de *E. invadens*, cultivada en condiciones axénicas a 25° C y crecida en medio BI-S-33 (30), suplementado con 15% de suero bovino (inactivado previamente a 56° C durante 30 min) y con 3% de mezcla de vitaminas de Diamond; el pH del medio fue de 6.8.

### RESIEMBRA

Las células fueron incubadas en un baño con hielo y agua durante 5 minutos para provocar la separación de las amibas de las paredes del tubo y posteriormente fueron sembradas en tubos de 16 x 25 mm con tapon de rosca. Para los experimentos, los cultivos fueron tomados en fase logarítmica de crecimiento, el número de células se ajustó de  $0.5 - 1 \times 10^6 / \text{ml}$  y se resuspendieron en medio de cultivo nuevo; las amibas fueron contadas en cámaras de Neubauer.

### OBTENCION Y PREPARACION DE ERITROCITOS

Se obtuvieron eritrocitos humanos grupo A Rh (+) (siempre el mismo donador), en condiciones estériles y se lavaron dos veces con solución salino fisiológica. Los eritrocitos se almacenaron a 4°C en solución salino fisiológica con heparina por no más de 15 días. El número de eritrocitos fué ajustado a  $1 \times 10^7 / \text{ml}$  y se resuspendieron en solución fisiológica para su posterior utilización.

## FAGOCITOSIS

De los tubos de cultivo con trofozoítos en fase logarítmica se utilizó  $1 \times 10^6$  amibas y se incubó con 1 ml. de suspensión de eritrocitos ( $1 \times 10^7$ ) durante 30 min. a  $25^\circ\text{C}$ . Finalizada la incubación se detuvo la fagocitosis al agregar 10 ml. de agua destilada, con lo que se provocó rompimiento de los hematies libres y adheridos.

El tubo se centrifugó a 650 g durante 5 min. se decantó y se resuspendió la pastilla en 2.5 ml de medio BI-S-33; la muestra fué dividida en 6 alícuotas de 0.5 ml. La primera se fijó inmediatamente con 1 ml de glutaraldehído al 2% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 durante 30 min, después se lavó con amortiguador de cacodilatos pH 7.4, se resuspendió en el mismo amortiguador y se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  hasta la tinción de los eritrocitos.

El segundo grupo se fijó después de 3 horas de incubación a  $25^\circ\text{C}$  en medio BI-S-33, de la misma manera que el anterior y se resuspendió en el amortiguador de cacodilatos. Las muestras 3, 4, 5 y 6 se fijaron después de 6, 9, 12 y 14 horas de incubación a  $25^\circ\text{C}$  en medio de crecimiento, para ello se siguió el mismo procedimiento que en los casos anteriores. Los experimentos fueron realizados al menos por triplicado.

## TINCION Y EVALUACION DE ERITROCITOS FAGOCITADOS

Para visualizar adecuadamente los eritrocitos fagocitados se utilizó el método de Novikoff et.al.(31), para la demostración de peroxisomas, con el cual se tiñen los eritrocitos localizados en el interior de las amibas. A las células fijadas se les descartó el amortiguador, se lavaron con TRIS-HCl 0.05 M pH 7.6, se concentraron por centrifugación a 650 g durante 5 min y se resuspendieron en 1 ml de TRIS-HCl al que se le agregaron 2 mg/ml de 3,3 diaminobencidina y se incubó durante 10 minutos, inmediatamente se agregaron 0.02 ml de agua oxigenada al 10% y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación cada 10 min. Las preparaciones se lavaron 2 veces con TRIS-HCl 0.05 M y se concentraron por centrifugación a 350 g durante 5 min. De la suspensión se hicieron preparaciones en fresco y se contaron los eritrocitos ingeridos en 100 amibas elegidas al azar y se calculó: a) el promedio de amibas que fagocitaron eritrocitos y b) el promedio de eritrocitos por amibas.

## EXPERIMENTOS CONTROL

Trofozoítos de Entamoeba invadens crecidos bajo las mismas condiciones que se mencionan arriba fueron utilizadas para los controles.

Control Numero 1.

Se incubó 1 ml de amibas con 1 ml de eritrocitos durante 30 min. se agregaron 10 ml de agua destilada para provocar el rompimiento de los eritrocitos no fagocitados, se centrifugó, se decantó y se suspendió la pastilla en 1 ml de glutaraldeido al 2%. La fijación se realizo durante 30 min, inmediatamente despues se lavó 2 veces con amortiguador de cacodilatos y se resuspendió en medio de crecimiento. La muestra fué incubada durante 24 horas y posteriormente se tiñeron los eritrocitos y se calculó el promedio de amibas con eritrocitos, asi como el promedio de eritrocitos por amiba.

Control Numero 2.

Los eritrocitos fueron fijados durante 30 minutos con glutaraldeido al 2%, posteriormente se lavaron exhaustivamente con solución fisiológica y se resuspendieron en 1 ml de la misma solución. Para la fagocitosis de eritrocitos fijados, se incubó 1 ml de amibas suspendidas en BI-S-33 con 1 ml de eritrocitos. Posteriormente los eritrocitos no fagocitados fueron separados de las amibas por medio de lavados sucesivos con solución salino fisiológica, después de que estos se adhirieron al sustrato. Los trofozoítos fueron resuspendidos en 2.5 ml de BI-S-33; la muestra fué dividida en 5 alicuotas e incubada durante : 0,3,6,9 y 12 horas respectivamente. La tinción de eritrocitos fagocitados se realizó del modo descrito anteriormente.

Ambos controles fueron realizados por triplicado.

## RESULTADOS

El grado de eritrofagocitosis de los trofozoítos de E. invadens de la cepa IP-1 se determinó después de 30 min de interacción y como se observa en la fig. 1, el 82 % de las amibas presentaron eritrocitos en su interior. De la población de trofozoítos en los cultivos utilizados, se pudieron distinguir cuatro subpoblaciones en base a su eficiencia fagocítica (Fig. 2). Entre ellas un grupo de trofozoítos fue deficientes en fagocitosis y correspondió al 18% de la población total. La gran mayoría de las amibas del cultivo (70.4%) fueron células que fagocitaron de 1-10 eritrocitos. Un 10.6% de trofozoítos presentaron de 11-20 eritrocitos, mientras que solo el 1 % restante de la población ingerió mas de 20 eritrocitos.

En la fig. 3 se muestra un panorama de la población amibiana después de 30 min de interacción con eritrocitos. Estos se observaron como cuerpos redondos densos, en un fondo translúcido que es el citoplasma de la amiba; en la misma figura se observan variaciones en el número de eritrocitos/amiba en las diferentes células, entre las que sobresalen trofozoítos incapaces de ingerir hematíes. En la fig. 4 se observa un trofozoíto con 22 eritrocitos en su interior y otro incapaz de fagocitar.

Durante el ensayo de la fagocitosis de eritrocitos fué posible distinguir claramente las dos etapas basicas de la eritrofagia a) adhesión de los hematíes a la superficie celular y b) incorporación de los eritrocitos al interior de la célula; no sin antes sufrir una deformación al atravesar la membrana plasmática. En general los trofozoítos se observaron muy vacuolados, y no fué posible observar la fusión entre fagosomas y lisosomas.

No se distinguió una polaridad funcional de los trofozoítos en lo que se refiere a la fagocitosis, las amibas fueron capaces de engullir hematíes por cualquier parte de su superficie, formando generalmente un pequeño velo citoplasmico que envolvió a las células.

Durante el proceso digestivo los hematíes disminuyeron de tamaño sin perder su redondez, hasta quedar reducidos a pequeños cuerpos (fig. 5 - 8). Ocasionalmente después de 12 horas de digestión existieron trofozoítos que presentaron en su interior de 10 a 15 eritrocitos, la mayoría de estos se observaron íntegros al analizarlos con el microscopio optico (Fig.9).

La cuantificación de los eritrocitos fué posible gracias a la tinción utilizada, en la fig.1 se muestra el porcentaje de trofozoítos con eritrocitos en su interior en función del tiempo, lo cual es un reflejo de la velocidad degradativa de eritrocitos por *E. invadens*. Se encontró una clara disminución en el número de amibas con eritrocitos conforme avanzó la etapa digestiva (Fig.5 - 8), la máxima degradación se realizó en las primeras 3 horas de incubación (30% aprox.). De las 6 a las 12 horas el proceso continuo en una forma relativamente constante y a las 14 horas no fué posible distinguir eritrocitos lo que indica que este tipo de células son degradados en un lapso de 14 horas aproximadamente. Cuando se compararon los resultados de los diferentes tiempos entre si existieron diferencias estadísticamente significativas.

La fig.10 muestra el número promedio de eritrocitos/amiba en los diferentes periodos de incubación. El avance en el proceso digestivo se manifestó por un descenso en el número de eritrocitos en relación al tiempo. Al igual que en la fig.1 la máxima tasa digestiva fué lograda durante las primeras 3 horas.

Los resultados del experimento control 2 se muestran en la fig.11 se observó una ligera disminución en el número de amibas con eritrocitos (7%), después de 12 horas de digestión. Así mismo se encontró una disminución en el número de eritrocitos/amiba, de 6.7 a 4.7 al término de 12 horas de incubación. Por otro lado el control con amibas y eritrocitos fijados no mostró cambios después de 24 horas de incubación en B1-S-33, comparados con los trofozoítos a los 30 minutos de incubación.



Fig.1.Velocidad degradativa de eritrocitos humanos por E.invadens  
Después de 30 min. de interacción se encontró un 82 % de trofozoítos con hematíes en su interior,este porcentaje se tomo como tiempo 0:0 para la evaluación de la degradación. La máxima digestión es observada después de 3 hrs.de incubación(30%).Al terminó de las 14 horas no se observaron amibas con eritrocitos. Los valores representan la media de 7 experimentos realizados.

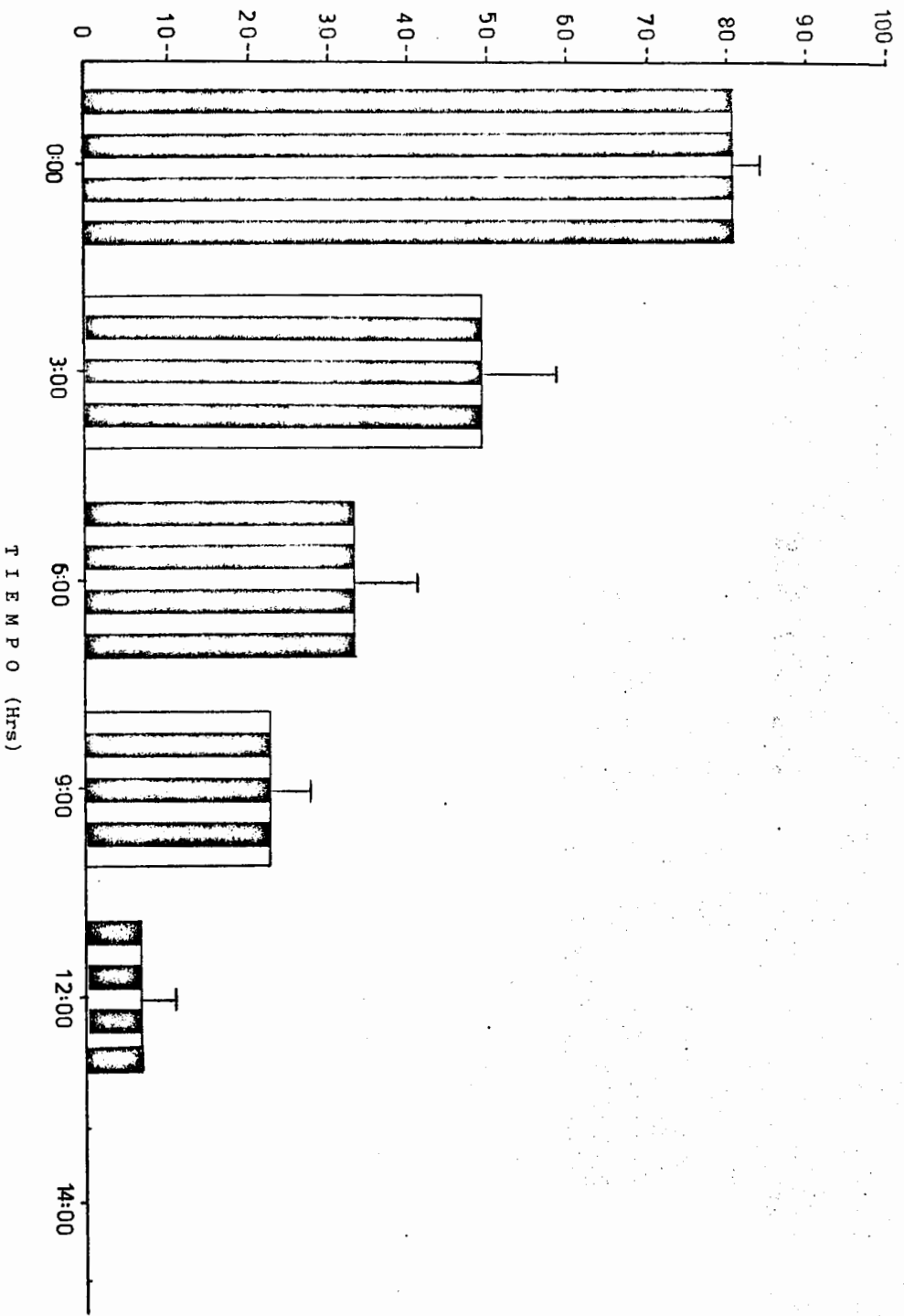


FIG.1

Fig.2. Tasa fagocítica de subpoblaciones de E.invadens. Cuatro subpoblaciones de amibas se agruparon en base a su capacidad fagocítica. La mas numerosa (70.4%) corresponde a trofozoítos con 1-10 eritrocitos; el 10.6% presenta de 11-20 hematíes ; un 18% son defectivas en esta capacidad y solo el 1% de la población muestra de 21-30 eritrocitos/amiba. Los valores representan la media de 7 experimentos.

% DE TROFOZOITOS

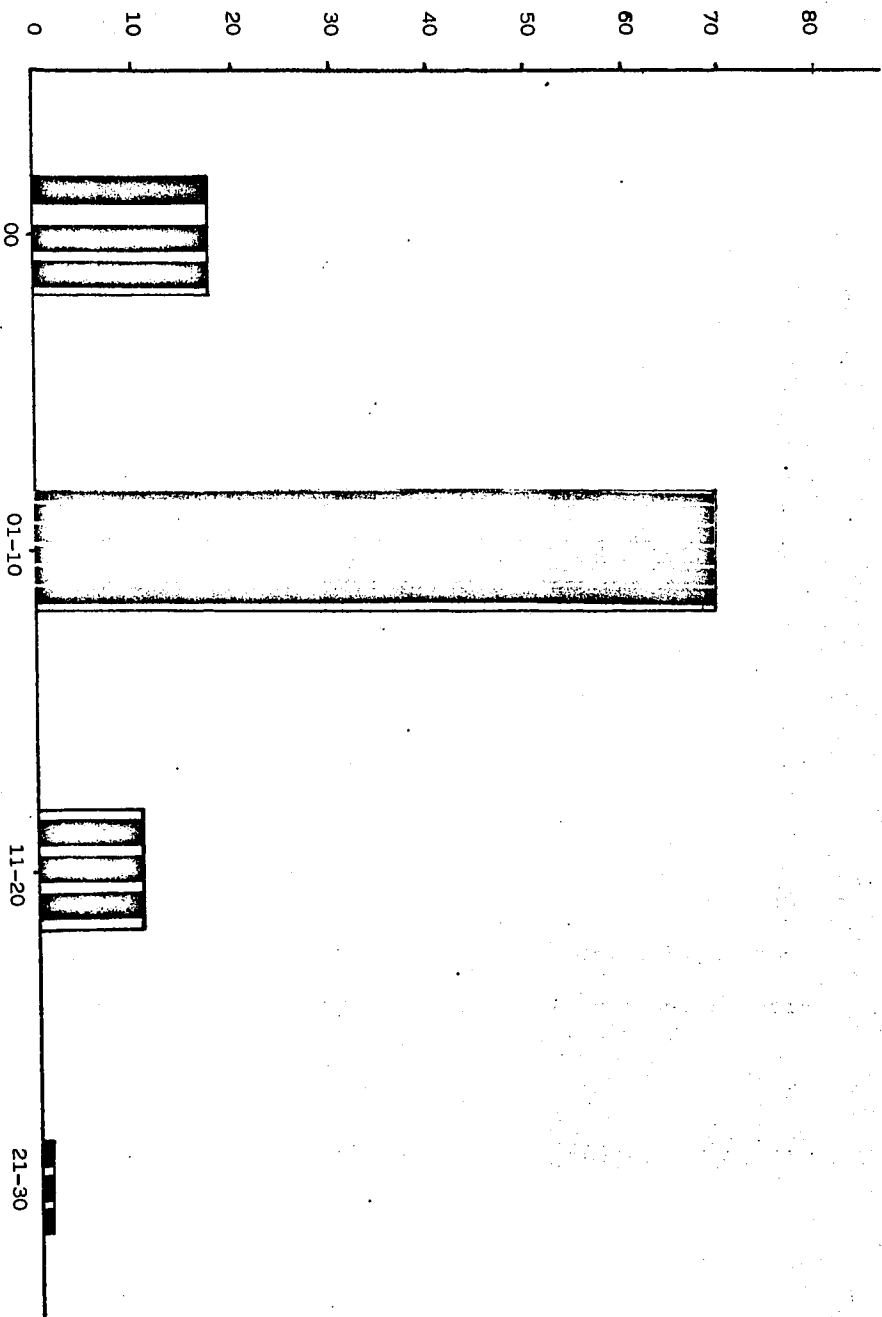


Figura.2

ERITRO/AMIBA

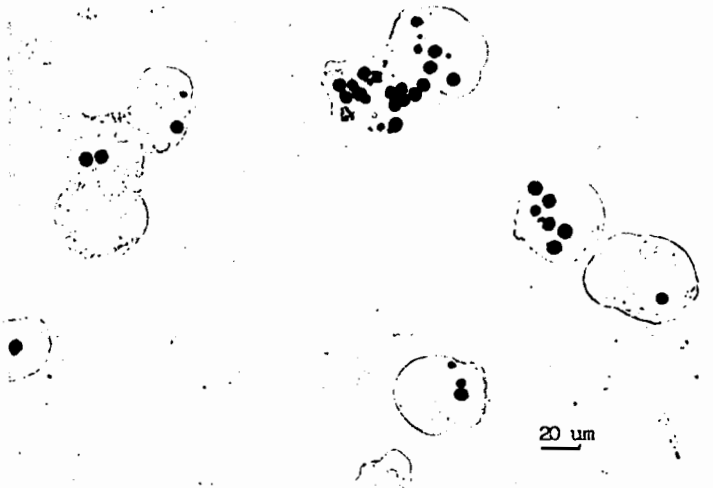
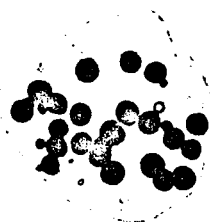
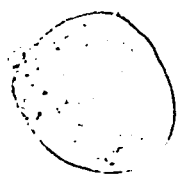


Fig.3. Subpoblaciones de E. invadens. Panorámica de la población de trofozoítos después de 30 min de interacción con eritrocitos es posible observar la heterogeneidad del cultivo en su capacidad fagocítica.



20um

Fig.4. Eritrofagocitosis de Entamoeba invadens. Esta figura muestra 2 trofozoítos después de 30 minutos de interacción con eritrocitos, se observan marcadas diferencias en su capacidad fagocítica, mientras una amiba presenta 22 hematies, la otra es incapaz de fagocitarlos.



20 um

Fig.5 Degradación de eritrocitos por E. invadens. Después de 3 horas de digestión se observan en los trofozoítos hematíes en diferentes etapas de degradación, algunos han disminuido su tamaño (flechas).



20 um

Fig.6 Degradación de eritrocitos por E. invadens. Después de 6 horas de incubación se observa una disminución en el número de amibas con eritrocitos, así como disminución en el tamaño de los mismos.





20  $\mu$ m

Fig.7. Degradación de eritrocitos por E. invadens. El proceso digestivo se manifiesta por la disminución en el tamaño de las vacuolas, hasta quedar reducidas a grumos esferoidales (flechas), después de 9 horas.



20 um

Fig.8. Degradación de eritrocitos por E.invadens. Después de 12 horas de incubación es posible observar una disminución tanto en el número de amibas con eritrocitos, como en los eritrocitos/amiba.



20  $\mu$ m

Fig.9. Degradación de eritrocitos por E. invadens. Ocasionalmente se encontraron trofozoítos con 10-15 eritrocitos en su citoplasma después de 12 horas de haber iniciado el proceso digestivo.

Fig.10. Velocidad degradativa de eritrocitos humanos por Entamoeba  
invadens. Esta grafica muestra una disminuci3n en el n3mero de eri-  
trocitos por amiba conforme avanza el tiempo de incubaci3n. La m3-  
xima degradaci3n es observada en las primeras 3 horas (de 5.5 a  
3.2 eritrocitos/amiba); despu3s de 14 horas es difıcil distinguir  
eritrocitos en el interior de las amibas. Los valores representan  
la media de 7 experimentos.

ERITROCITOS/AMIBA

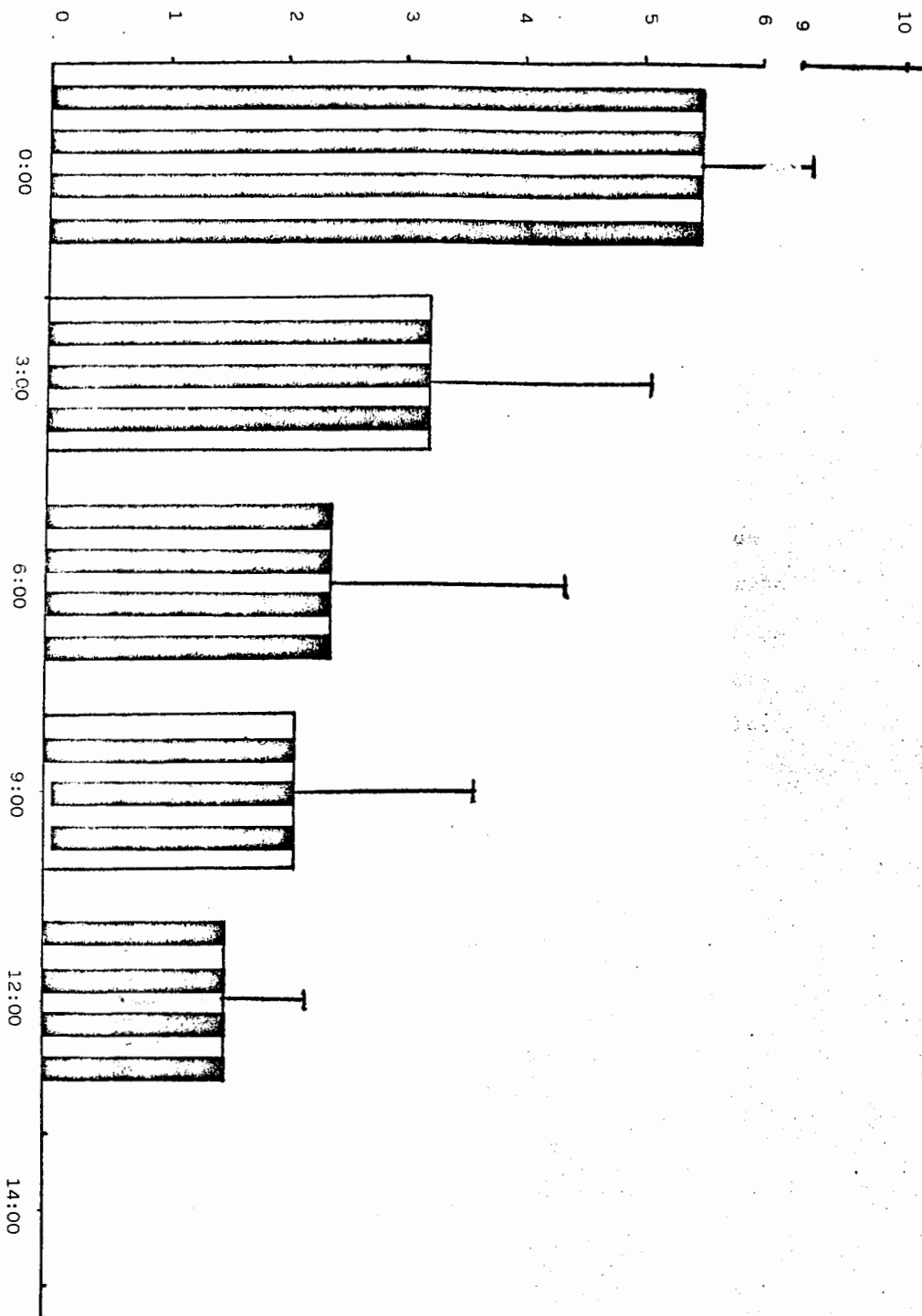


Figura. 10

T I E M P O (Hrs.)

Fig.11. Experimento control. Se encontró una ligera disminución (7%) en el número de amibas con eritrocitos y en el de eritrocito por amiba (6.7 a 4.7) después de 12 horas de incubación, cuando se realizó la fagocitosis y degradación de eritrocitos fijados. Estos resultados contrastanv ampliamente con los mostrados en las fig. 1 y 10.

% DE AMIBAS CON ERITROCITOS

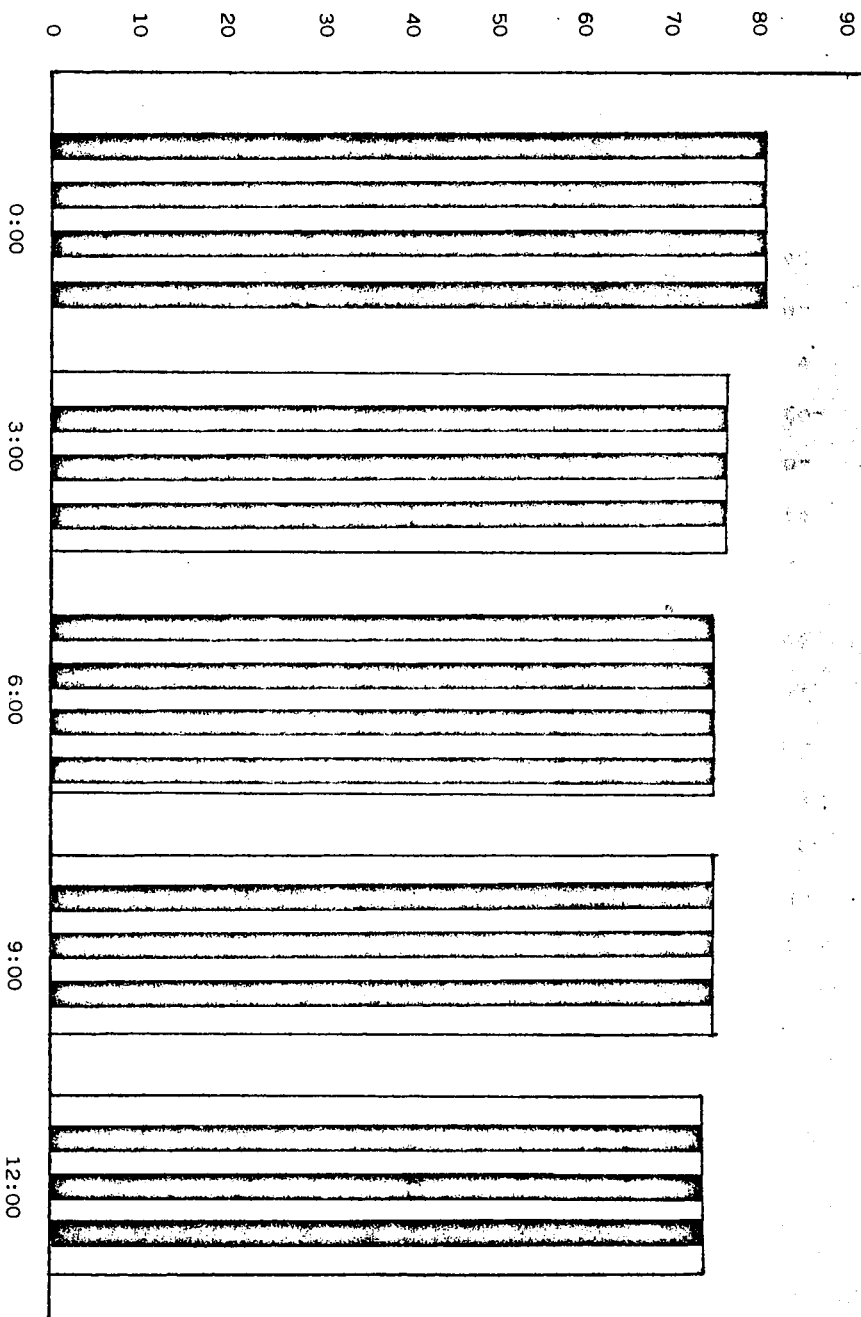


Figura. 11

T I E M P O (Hrs.)

## DISCUSION

Los presentes resultados demuestran que E. invadens una especie aislada de reptiles, muestra una alta tasa fagocítica de eritrocitos humanos in vitro. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Trissl y Martínez Palomo (32) en lo que se refiere al porcentaje de amibas con eritrocitos, sin embargo muestran diferencias en el número de eritrocitos/amiba; 5.5 contra 4 respectivamente. Esta diferencia adquiere mas importancia si tomamos en cuenta que estos investigadores utilizaron 100 eritrocitos por trofozoíto o sea 10 veces mas eritrocitos que en este estudio.

La cuantificación de los eritrocitos fagocitados fué facilitada por las siguientes condiciones: a) una cantidad 10 veces mayor de eritrocitos en relación con las amibas, lo que aumentó las posibilidades de interacción en tiempos cortos, b) la lisis de eritrocitos libres y adheridos por medio shock osmótico, el cual no dañó a los trofozoítos y c) la tinción de los eritrocitos fagocitados por medio de la reacción a la bencidina, una tecnica citoquímica que facilitó la visualización de los eritrocitos dentro del citoplasma de la amiba.



La adherencia constituye el primer paso del proceso fagocítico y está mediado por receptores específicos principalmente de tipo lectinas (33), las cuales establecen una unión de tipo no covalente con receptores de los eritrocitos, por lo tanto la ausencia de receptores en algunas amibas pudiera ser uno de los factores responsables de las diferencias encontradas en relación a la capacidad fagocítica de las subpoblaciones amibianas.

Mucho se ha discutido sobre la posibilidad de que los medios de crecimiento sintéticos alteran o pueden alterar las características nativas de las células. Actualmente Entamoeba invadens y otras especies se crecen en medios artificiales y por lo tanto podrían estar sujeta a alteraciones de sus procesos causados por el medio de cultivo.

El hecho de encontrar una población de amibas defectiva en fagocitosis, hace pensar que el tiempo de incubación entre amibas y eritrocitos pudiera haber sido insuficiente para que la totalidad de la población amibiana estableciera contacto con los hematíes. Pero como lo demostraron Trissl y Martínez-Palomo en 1978, no existe una relación entre el aumento del período de incubación y el aumento en el porcentaje de amibas con eritrocitos. Estos autores incubaron E. invadens y E. histolytica con eritrocitos humanos durante 3 horas y encontraron una tasa de fagocitosis semejante a la alcanzada a los 30 min. de incubación (32). Una posible explicación para las diferencias en la capacidad fagocítica de la cepa IP-1 de E. invadens podría ser que los cultivos están compuestos

de una mezcla heterogénea de clones. O bien que se encuentran en diferentes fases del ciclo celular.

Es evidente que E. invadens posee una adecuada maquinaria enzimática para digerir los eritrocitos humanos, como se demostró en este estudio, apoyados por el hecho de que en los controles no hubo degradación de hemáties. Durante varias décadas han existido algunas controversias concernientes a la naturaleza lisosomal de las vacuolas de E. histolytica y E. invadens. El problema se origina porque en la gran mayoría de los lisosomas encontrados en células animales, las enzimas lisosomales no se encuentran unidas a las membranas que limitan las vacuolas (34). En el caso de Entamoeba invadens ensayos citoquímicos y bioquímicos han demostrado que al menos una de las enzimas típicas de lisosomas, la fosfatasa ácida, no se encuentra en forma soluble, sino asociada a la parte interior de la membrana, tal como sucede en E. histolytica (26-28). Parece entonces que las vacuolas presentes en E. invadens son en realidad un tipo especial de lisosoma que contienen una variedad de enzimas hidrolíticas, cuya actividad máxima podría ser a pH ácido.

De la misma manera que la presencia de trofozoítos que poseen una nula o baja tasa fagocítica es un hallazgo raro, el hecho de encontrar amibas deficientes en degradación es un resultado no reportado hasta el momento, el cual puede estar mediado por varios factores. Uno de ellos sería el hecho de que estas amibas carecen de las enzimas hidrolíticas. Por otra parte Hart (35), ha mencionado

la importancia de los movimientos lisosomales para que la fusión entre fagosomas y lisosomas pueda llevarse a cabo. Este autor sostiene que los agentes que afectan la fusión pueden operar directamente sobre esta o bien alterando los movimientos de los lisosomas y así la frecuencia de su contacto. Posiblemente las amibas deficientes en degradación no sean capaces de efectuar la fusión entre fagosomas y lisosomas, y en consecuencia las enzimas hidrolíticas aunque existan, no actúan sobre los eritrocitos.

Bowers (36), encontró que *Acantamoeba* posee la capacidad de distinguir partículas nutritivas de las no nutritivas. Las partículas no digeribles son rápidamente expelidas de las células, mientras que los materiales digeribles continúan su degradación en el interior de la célula. En los experimentos con los eritrocitos fijados las amibas no pudieron distinguir entre partículas degradables y no degradables lo que indica que *E. invadens* no posee los mecanismos que *Acantamoeba*.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ratcliffe, H.L. ; Geiman, Q.M.: Amebiasis in reptiles.  
Science 79: 324 (1934).
- 2.- Rodhain, J.: Entamoeba invadens n.sp.; parasite de serpents.  
C.R. Soc. Biol. Paris 118:1146 (1934).
- 3.- Geiman, Q.M. ; Ratcliffe, H.L.: Morphology and life cycle of  
an amoeba producing amoebiasis in reptiles. Parasitology, 28:  
208-228 (1936).
- 4.- Kudo, R.R: Protozoologia. CECSA: pp. 413-432 (1971).
- 5.- Martinez-Palomo, A.; The biology of Entamoeba histolytica.  
Research Studies Press a Division of John Wiley and Sons.  
New York (1982).
- 6.- Chevez, A.; Segura, M.; Iturbide, I.: Aspectos morfologicos en la  
biología del trofozoíto de Entamoeba histolytica desde el punto  
de vista de citología dinamica. Arch. Invest. Med. (Mex), 2 (supl.1):  
229-244 (1971).
- 7.- Deutsch, K. ; Zaman, V: An electron microscopic study of  
Entamoeba invadens Rodhain 1934. Exp. Cell, Res. 17:310-319  
(1959).
- 8.- Barker, D. ; Swales, L.S.: Characteristics of ribosomes during  
differentiation from trophozoite to cyst in axenic Entamoeba sp.  
Cell Diff. 1 : 297-306 (1972).

- 9.- Martinez-Palomo,A.; Gonzalez-Robles,A: Fijación e inclusión in situ de Entamoeba histolytica: Aplicaciones en estudios de morfología y citoquímica ultramicroscópica.  
Arch. Invest. Med. (Mex.),5 (supl.2):283-292 (1974).
- 10.- Kettis,A.A. ; Lidman,K. ; Fragaesus,A.: Actin in Entamoeba histolytica trophozoites revealed by human antibodies actin.  
J. Parasitol. 63 : 581-583 (1977).
- 11.- Sabanero,M.; Meza,I.: Localización de actina en trofozoítos de Entamoeba histolytica (HM1). Arch. Invest. Med. (Mex.) 13 (supl.3) : 37-42 (1982).
- 12.Morales-Vallarta,M.; Mata,D.B.: División nuclear y presencia de microtubulos en la diferenciación de Entamoeba invadens.  
Arch. Invest. Med. (Mex.)13 (supl.3) : 211-216 (1982).
- 13.-Keller,P.M; Morgan,N.H.; Morgan,R.S.; Czeto,A.R.: Tubulin in cysts of Entamoeba invadens. J. Cell Biol. 59:165a (1973).
14. Pinto da Silva,P.; Martinez-Palomo,A. ; Gonzalez-Robles,A.: Membrane structure and surface coat of Entamoeba histolytica. Topochemistry and dynamics of the cell surface: cap formation and microexudate. J. Cell Biol. 64: 538-550. (1975).
- 15.- Albach,A.R.; Blooden,T.: Concepts of function of peripheral non-chromatin and endosome in Entamoeba histolytica.  
Arch. Invest. Med. (Mex.),11 (supl.1): 63 (1980).

- 16.- Cervantes,A.; Martinez-Palomo,A.:Estudio del ciclo vital de Entamoeba invadens mediante cinematografia espaciada. Arch. Invest. Med. (Mex.),11 (suppl.1): 31-40 (1980).
- 17.- Rengpian, S.; Bailey,G.B.: Differentiation of Entamoeba ; a new medium and optimal conditions for axenic encystation of Entamoeba invadens. J. Parasitol. 61 : 24-30 (1975).
- 18.- Arroyo-Begovich,A; Carabez-Trejo,A.: Identification of the structural component in the cyst wall of Entamoeba invadens J. Parasitol. , 66: 735-741.(1980).
- 19.- Chavez,B; Martinez-Palomo,: Estructura ultramicroscopica de la pared de quistes de Entamoeba invadens,E.histolytica y E.coli. Arch. Invest. Med. (Mex.) 9 (supl.1) : 113-116 (1978).
- 20.- Montalvo,F,E; Reeves,R.E. ; Warren,L.G.:Aerobic and anaerobic metabolism in Entamoeba histolytica. Exp. Parasitol. 30: 249-256 (1971).
- 21.- Charoenlarp,P ; Reeves,R.E. ; Warren,L.G.: Carbohydrate utilization by Entamoeba histolytica. Exp. Parasitol.23: 205-211 (1968).
- 22.- Harlow,D.R.; Weinbach,E.C. ; Diamond,L.S.: Nicotinamide nucleotide transhydrogenase in Entamoeba histolytica,a protozoan lacking mitochondria. Comparative Biochemistry and Physiology. 53B: 141-144.(1976).

- 23.- Martinez-Palomo,A.; Gonzalez-Robles.:Structural bases of citolitic mechanisms of Entamoeba histolytica. J. Protozool. 32: 166-175 (1985).
- 24.-Lopez-Revilla,R.;Said-Fernandez,S: Cytopathogenicity of Entamoeba histolytica: hemolytic activity of trophozoite homogenates. Am.J. Trop. Med. Hyg. 29: 209-212 (1980).
- 25.- Mc Coonachie,E.W.:Studies of Entamoeba invadens Rodhain 1934 'in vitro' and its relationship to some other species of Entamoeba. Parasitology 45: 452 (1955).
- 26.- Kairalla,A.B.; Hofbauer,A.F.; Pittman,J.C.: Isolation and characterization of phagosomes from axenic Entamoeba histolytica.Memorias de la Conferencia Internacional de Amibiasis. Ed. B. Sepulveda y L.S. Diamond, Instituto Mexicano del Seguro Social,Mexico.:238-248 (1975).
- 27.- Fastag de Shor,A.; Villegas-Silva,R.: Actividad de fosfatasa ácida en la interacción de Entamoeba histolytica y Toxoplasma gondii. Memorias de la Conferencia Internacional de Amibiasis: Ed. B . Sepulveda y L.S.Diamond, Instituto Mexicano del Seguro Social,Mexico: 138-141 (1975).
- 28.-Kobayashi,S.; Takeuchi,T.: Entamoeba histolytica. Ultrastructural localization de Ca<sup>2+</sup>- dependent nucleotidasas -. Exp. Parasitol. 54 : 202-212 (1982).

- 29.- Chevez,A.;Sepulveda,B.: Fases iniciales de la actividad patógena de E.histolytica sobre el colon y el hígado de hamster. Memorias sobre la Conferencia Internacional de Amibiasis. Ed. B.Sepulveda y Diamond,L.S., Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico.:418-491(1975).
- 30.- Diamond,L.S.; Harlow,D.R. ; Cunnick,C.C.: A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.; 72: 431-432 (1978).
- 31.- Novikoff,A.B.; Novikoff,P.M. ; Quintana,N.:Studies on microperoxisomes.II. A. Cytochemical method for light and electron microscopy. J.Histochem.Cytochem. 20: 1006 (1972).
- 32.- Drozco,E.M. ; Martinez-Palomo,A. ; Guarneros,G.: Receptores participantes en la adherencia de E.histolytica a eritrocitos humanos. Arch. Invest. Med. (Mex.) 13 (supl. 3) ; 177-183 (1982).
- 33.-Trissl,D.; Martinez-Palomo,A.: Surface properties of Entamoeba.Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. J. Exp. Med. 148: 1137-1145 (1978).
- 34.- Allison,A.C.: Lysosomes. Oxford Biology Readers. 58. Oxford University Press. (1974).
- 35.- Hart-D'Arcy,P.; Young,R.M.; Jordan,M.M.: Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal movements. J. Exp. Med. 58: 477-492 (1983).



36.- Bowers, B.; Olszewski, E.T.; Acanthamoeba discriminates internally between digestible and indigestible particles. J. Cell Biol. 97 : 317-322 (1983).

## CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se encontró una elevada capacidad fagocítica de Entamoeba invadens sobre eritrocitos humanos. Después de 30 minutos de interacción un 82 % de la población presentó cuando menos un eritrocito en su interior.
2. Existe heterogeneidad en la población amibiana en lo que respecta a su capacidad fagocítica, detectándose varias subpoblaciones entre las que sobresale un grupo que es defectivo en esta propiedad celular.
3. E. invadens posee un adecuado sistema enzimático capaz de degradar eritrocitos. Al cabo de 12 horas de incubación solo el 7% de los trofozoítos fue positivo a la bencidina, lo que demuestra la presencia de organelos de tipo lisosomal en el citoplasma, los cuales son los únicos capaces de realizar esta actividad con tanta rapidez.
4. Después de 14 horas los trofozoítos de Entamoeba invadens degradan completamente los eritrocitos.
5. En los cultivos utilizados hubo trofozoítos con posibles alteraciones en su mecanismo digestivo, ya que después de 12 horas de interacción mostraron de 10 a 15 eritrocitos, la mayoría de ellos íntegros cuando se observaron al microscopio óptico.



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
Facultad de Ciencias

Expediente .....

Número ..... 1167/86

Sr. José de Jesús Ramírez Córdova  
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "Fagocitosis y Degradación de Eritrocitos Humanos por *Entamoeba invadens*" para obtener la Licenciatura en Biología - con Orientación Biomédica.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado - como Director de dicha Tesis el M. en C. Juan Mora Galindo.



FACULTAD DE CIENCIAS

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara, Jal., Noviembre 28 de 1986

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario

Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. El M.en C. Juan Mora Galindo, Director de Tesis.-Pte.  
c.c.p. El expediente del alumno.

'mjsd

Guadalajara, Jal., Enero 5 de 1987.

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA,  
Director de la Facultad de Ciencias  
Universidad de Guadalajara,  
P r e s e n t e.

Estimado doctor Astengo Osuna:

Por este medio comunico a usted que el señor J. de Jesús Ramírez Córdova, Pasante de la Licenciatura en Biología, con número de registro 07748839, ha concluido satisfactoriamente el trabajo de Tesis titulada: FAGOCITOSIS Y DEGRADACION DE ERITROCITOS HUMANOS POR Entamoeba invadensa, realizado en la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del I.M.S.S.

Asimismo le informo que he revisado el manuscrito de la Tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,



M. EN C. JUAN MORA GALINDO  
Director de Tesis