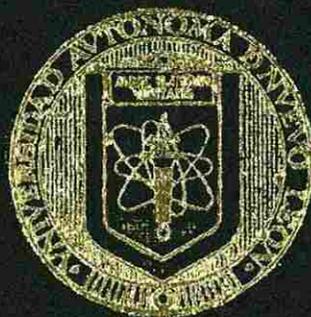


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



NUEVO METODO DE ENQUISTAMIENTO AXENICO DE
Entamoeba invadens E INDUCCION DE CUERPOS
CROMATOIDES EN FASE ACTIVA DE CRECIMIENTO

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.B.P. LICET VILLARREAL TREVIÑO

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1990

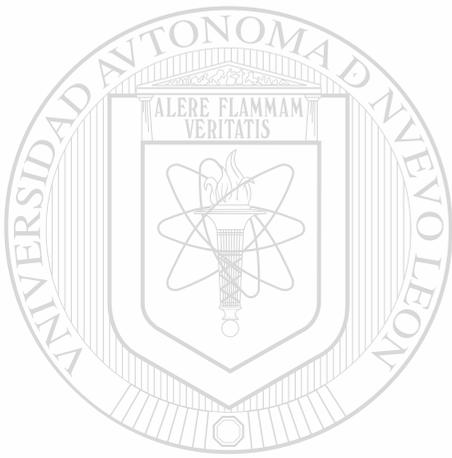
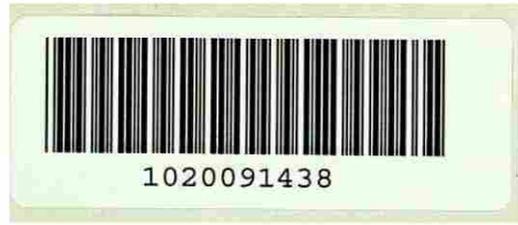
TM

Z5320

FCB

1990

V5



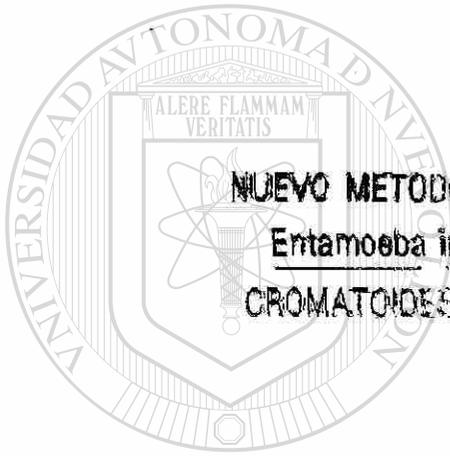
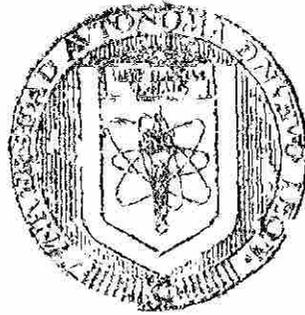
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



NUEVO METODO DE ENQUISTAMIENTO AXENICO DE
Entamoeba invadens E INDUCCION DE CUERPOS
CROMATOIDES EN FASE ACTIVA DE CRECIMIENTO

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Q.B.P. LICET VILLARREAL TREVIÑO

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1990

TM
25320
FCB
1990
V5

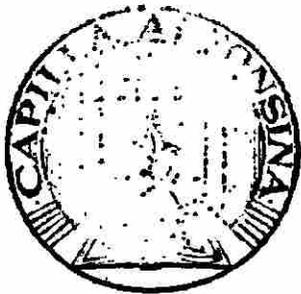


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



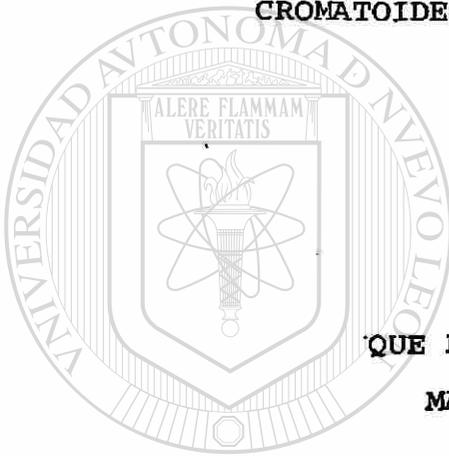
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



161966

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

NUEVO METODO DE ENQUISTAMIENTO AXENICO DE
Entamoeba invadens E INDUCCION DE CUERPOS
CROMATOIDES EN FASE ACTIVA DE CRECIMIENTO



T E S I S
QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

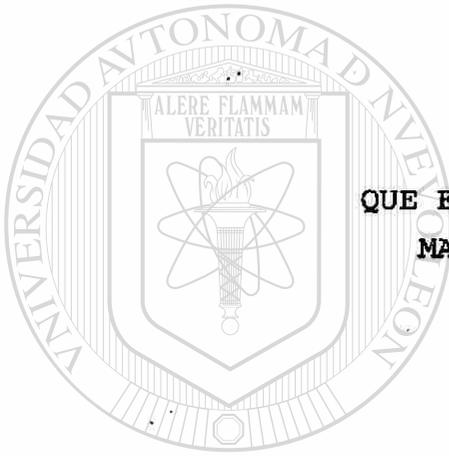
PRESENTA
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
Q.B.P. LICET VILLARREAL TREVIÑO

DIRECTOR


CAND. DR. MARIO R. MORALES VALLARTA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

NUEVO METODO DE ENQUISTAMIENTO AXENICO DE
Entamoeba invadens E INDUCCION DE CUERPOS
CROMATOIDES EN FASE ACTIVA DE CRECIMIENTO



T E S I S
QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.B.P. LICET VILLARREAL TREVIÑO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN



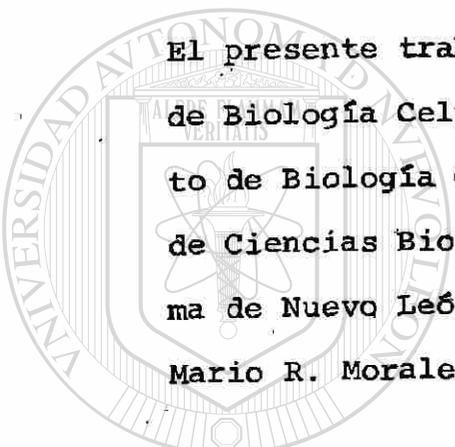
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

COMISION DE TESIS

M. en C. LUIS J. GALAN WONG
PRESIDENTE

M. en C. J. ANTONIO HEREDIA ROJAS
SECRETARIO

M. en C. GERARDO GUAJARDO MARTINEZ
VOCAL



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular y Fisiología del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Cand. Dra Mario R. Morales Vallarta

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A MI ESPOSO: Alberto

Quien con su amor, cariño y paciencia me - -
alienta cada día a seguir adelante para al--
canzar nuevas metas en mi vida.

A MIS HIJOS: Alberto, Lizeth y Melissa

A quienes tanto quiero y son el motivo de mi
superación.

A MIS PADRES: Josué y Rosa

Quienes con su cariño, comprensión y apoyo,
me infundieron la suficiente capacidad para
lograr muchas cosas buenas en la vida.

A MIS HERMANOS: Mirna Nohemí y José Manuel

Josué y Lulú

Carlos Moisés y Nora

Eliud

Rosa Iliana y Mario

Por la gran suerte de tenerlos y la alegría
de convivir con ellos.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
AGRADECIMIENTOS	xii
RESUMEN	xiv

I.- INTRODUCCION	1
------------------	---

II.- ANTECEDENTES	3
-------------------	---

III.- HIPOTESIS	10
-----------------	----

IV.- OBJETIVOS	11
----------------	----

V.- MATERIALES	12
----------------	----

A.- Origen de los reactivos.	12
------------------------------	----

B.- Material biológico.	12
-------------------------	----

C.- Preparación del medio de cultivo	13
--------------------------------------	----

TP-S-1 de Diamond (sin vitami---

nas).

D-O.- Preparación y composición de -	14
--------------------------------------	----

las soluciones especiales y de -

uso rutinario.

VI.- METODOLOGIA	18
------------------	----

A.- Mantenimiento de la cepa.	18
-------------------------------	----

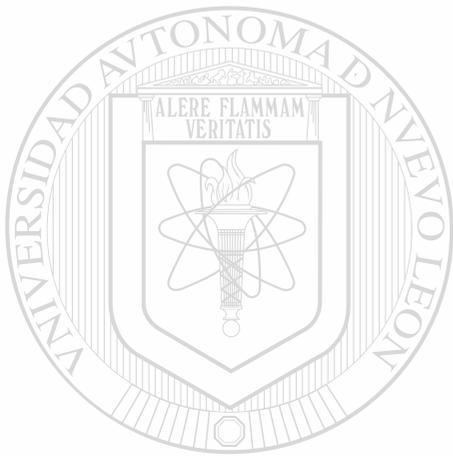
B.- Cinética de crecimiento normal.	18
-------------------------------------	----

C.- Determinación de la densidad ce-	18
--------------------------------------	----

lular.

D.- Cinética de crecimiento con alta tensión de CO ₂ .	19
E.- Gaseo de los tubos con CO ₂ .	19
F.- Crecimiento de trofozoitos con - alta tensión de CO ₂ para observa ción en microscopía.	19
G.- Inducción del enquistamiento con alta tensión de CO ₂ y ayuno de - glucosa,	20
H.- Observación con microscopía de - fluorescencia.	20
I.- Microscopía electrónica de ba--- rrido.	21
J.- Microscopía electrónica de trans misión.	21
<hr/>	
K.- Prueba de viabilidad de quistes.	22
<hr/>	
VII.- RESULTADOS Y DISCUSION	23
A.- Cinética de crecimiento	23
B.- Inducción de cuerpos cromatoides con alta tensión de CO ₂ .	23
C.- Inducción de enquistamiento.	30
D.- Caracterización del quiste.	30
E.- Ventajas del método.	35
F.- Tabla 1 - Comparación entre dis tintos métodos de enquistamiento de <u>Entamoeba invadens</u>	36

VIII.- CONCLUSIONES	La	39
IX.- CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS		40
X.- LITERATURA CITADA		41



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE ABREVIATURAS

mOs	Miliosmoles
μ	Micras
ml	Mililitros
mm	Milímetro
l	Litros
h	Horas
<u>N</u>	Concentración Normal
g	Gramos
min	Minutos
°C	Grados centígrados
<u>X</u>	Concentración con respecto a la solución de trabajo
pH	Potencial hidrógeno
<hr/>	
rpm	Revoluciones por minuto
%	Por ciento
Å	Amstrong
lb	Libras
pulg ²	Pulgadas cuadradas
DDSA	Dodecenil succínico anhídrido
NMA	Metil nádicico anhídrido
DMP	2-4-6 tridimetilamino metil fenol
fig (s)	Figura, figuras
Kv	Kilovatio
log	Logaritmo
Kg	Kilogramos

LISTA DE FIGURAS

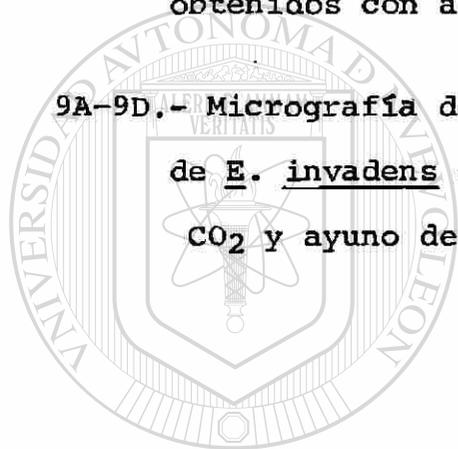
- 1.- Aparato utilizado para gasear los cultivos con CO₂.
- 2.- Cinética de crecimiento de Entamoeba invadens IP-1 en medio TP-S-1.
- 3A y 3B.- Micrografía electrónica de trofozoitos de E. invadens al inicio de la fase-log, crecidos con alta tensión de CO₂.
- 3C, 3D y 3E.- Presencia y ultraestructura de cuerpos cromatóides en trofozoitos de E. invadens en fase log crecidos con alta tensión de CO₂.
- 3F.- Corte semifino que muestra la presencia de cuerpos cromatóides en trofozoitos de E. invadens con 10 días de crecimiento con alta tensión de CO₂.
- 3G.- Ultraestructura en sección longitudinal de un cuerpo cromatóide de un trofozoito con 4 días en cultivo con alta tensión de CO₂.
- 4.- Micrografía electrónica de un trofozoito testigo con 4 días en cultivo, crecido con tensión normal de CO₂.
- 5.- Formas quísticas de E. invadens inducidas por alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa, observadas por microscopía de contraste de fase.

6A y 6B.- Evidencia de la afinidad del calcofluor M2R por la superficie de las formas quísticas de E. invadens.

7A y 7B.- Micrografías obtenidas por microscopía de barrido de quistes formados en medio AEM y con alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa.

8A y 8B.- Micrografía electrónicas de transmisión de quistes obtenidos con alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa.

9A-9D.- Micrografía de microscopio de barrido de trofozoitos de E. invadens con 60 o más horas con alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

Al Biól. Mario R. Morales Vallarta por brindarme su amistad, gran parte de su tiempo, comprensión, valiosas enseñanzas, y una excelente dirección durante el transcurso del presente trabajo.

Al M. en C. Luis J. Galán Wong por ser mi asesor y brindarme su apoyo durante la maestría, por sus consejos y valiosas sugerencias en la revisión de la tesis.

Al M. en C. Gerardo Guajardo Martínez por su interés - - constante y valiosos consejos durante la revisión de esta tesis.

Al M. en C. José Antonio Heredia Rojas por su gran interés y apoyo que me brindó siempre y sus valiosas sugerencias en la revisión de este escrito.

A la Unidad de Microscopía Electrónica de la Fac. de - - Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., grandemente al Q.B.P. - - José Ruíz Ordoñez por su gran ayuda.

Al Departamento de Biología Celular y Genética, muy especialmente al Biól. Jorge Verduzco Martínez por brindarme todo su apoyo para que este trabajo se realizará.

Al Dr. Reyes S. Tamez Guerra Director de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. por todas las facilidades que me otorgó para la realización de esta tesis.

Al Q.F.B. Enrique Ramírez Bonn del Departamento de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. por su valiosa cooperación.

A la Q.B.P. Ma. Manuela Vela Franco por su amistad sincera y desinteresada; por la gran ayuda que me brindó durante todo el transcurso de mi maestría y en la realización de este trabajo.

A la Srita. Dora A. Martínez Villarreal por su valiosa y desinteresada ayuda en la escritura mecanográfica de esta tesis.

A la Srita. Irma Portillo de quien recibí una gran ayuda.

A todas las personas que me ayudaron de una u otra forma a la realización de este trabajo.

RESUMEN

Es conocido que las modificaciones en el medio de cultivo inducen cambios en la estructura y crecimiento de trofozoitos de Entamoeba. Ante tales antecedentes nos planteamos la hipótesis de que "la alta tensión de CO₂ en medio de cultivo axénico, induce la formación de cuerpos cromatoides en trofozoitos de Entamoeba invadens durante su crecimiento activo. El hallazgo de cuerpos cromatoides al probar la anterior hipótesis y los antecedentes de requerimiento de ayuno de glucosa para inducir enquistamiento en Entamoeba, nos permitió plantear que "la carencia de glucosa y la alta tensión de CO₂ en el medio de cultivo, inducen el enquistamiento de Entamoeba invadens. En base a las dos anteriores hipótesis trabajamos hacia los siguientes objetivos: a) Determinar la presencia de cuerpos cromatoides durante la fase de crecimiento de trofozoitos de Entamoeba invadens que crecen axénicamente con alta tensión de CO₂ y b) Determinar el efecto de la alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa en el medio TP-S-1 en la posible inducción del enquistamiento de E. invadens.

Trofozoitos de E. invadens IP-1 crecidos en 10 ml de medio TP-S-1 sin vitaminas y con alta tensión de CO₂ (con un flujo aproximado de 0.2 l/min/2 min) mostraron un rendimiento semejante al testigo. El análisis de la ultraestructura en la mitad de la fase-log mostró la presencia de abundantes cuerpos

cromatoides, los cuales fueron también observados desde el -- tercer día de cultivo hasta terminada la fase-log. Asimismo, el crecimiento de trofozoitos con alta tensión de CO₂ por 4 a 6 días con una transferencia posterior a un medio sin glucosa también con alta tensión de CO₂, indujo el enquistamiento con un rendimiento de 80 a 90% alcanzado a las 50 a 60 h después de la transferencia al medio sin glucosa. La caracterización de los quistes producidos demostró que son estructuralmente maduros y viables. El presente método ofrece ventajas sobre otros previamente publicados, tales como el no-requerimiento de tiempo de maduración, ni la necesidad de células en óptimo crecimiento (mitad de la fase-log). En conclusión: a) La -- formación de cuerpos cromatoides puede ser inducida en trofozoitos de E. invadens aún durante la fase activa de crecimiento (fase-log) si éstos son crecidos con alta tensión de CO₂ y

b) Se ha desarrollado un nuevo y eficiente método para inducir enquistamiento in vitro en E. invadens.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

I. INTRODUCCION

Las amibas del género Entamoeba tienen importancia especial para su estudio por incluir especies parásitas y patógenas para el hombre y algunos animales. De estas especies, las más estudiadas y conocidas son Entamoeba histolytica, Schaudinn, 1903 y Entamoeba invadens, Rodhain, 1934.

La amibiiasis representa un gran problema de salud pública en México y otros países. Esta enfermedad cuyo causal en el hombre es E. histolytica es típica de los países con clima tropical. Sin embargo, la disentería amibiana es bastante ubicua y se le encuentra también en las regiones templadas.

La estructura de Entamoeba se conoce a partir de estudios al microscopio electrónico de las formas vegetativas; son numerosos los trabajos al respecto (1-4, 13, 20, 21, 26) por lo que, la ultraestructura de los trofozoitos cultivados in vitro es bien conocida.

El cuidadoso estudio de la morfología y ciclo vital de E. invadens realizado por Geiman y Ratcliffe (14) tanto in vitro como in vivo, les condujo a concluir que E. invadens y E. histolytica son extraordinariamente semejantes, tanto que, morfológicamente son indistinguibles. En opinión de - - - - -
McConnachie (22), esta semejanza se extiende a los procesos de diferenciación y desarrollo metaquístico, de manera que --

una descripción de estos procesos en una especie es aplicable a la otra.

Este mismo investigador considera que desde los puntos de vista de morfología y patogenicidad, aunque en huéspedes diferentes, la semejanza entre E. invadens y E. histolytica es mayor que la que existe entre otras especies del mismo género.

Las razones anteriores explican por qué E. invadens, parásito de reptiles (29) es utilizado como modelo biológico experimental para la investigación en amibiasis, particularmente en aspectos de diferenciación, ya que E. invadens puede ser enquistada y desenquistada en el laboratorio, cosa que aún no es posible con E. histolytica.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

II. ANTECEDENTES

En estudios realizados al microscopio electrónico de E.-
invadens crecida axénicamente, se pudo observar que la amiba
 está rodeada por una membrana plasmática de cerca de 120Å de
 grosor. El componente mayor del citoplasma son las vacuolas
 de 0.2 a 0.3 μ de diámetro. Estas vacuolas son estructuras
 de baja densidad y tienen una membrana limitante definida, de
 la misma medida y de densidad que la membrana citoplasmática.
 No se encontró mitocondrias, ni aparato de Golgi. El retícu-
 lo endoplasmático está pobremente desarrollado. La sustancia
 del citoplasma contiene dos tipos de partículas: una de 200 -
 300 Å, de baja densidad y otra de 400 - 700 Å de más alta den-
 sidad. Las segundas probablemente representan partículas de
 glucógeno (30).

De los más conspicuos organelos citoplasmático se encuen-
 tran los cuerpos cromatoides (particularmente en quistes), --
 compuestos de RNA y proteínas. Estas estructuras consisten --
 de fibras helicoidales asociadas paralelamente. Los cuerpos
 cromatoides son encontrados principalmente en quistes de --
Entamoeba. Son inclusiones celulares en forma de barra o va-
 rilla, hasta de 10 μ de longitud (4).

Deutsch y Zaman (11), mediante el uso del microscopio --
electrónico demostraron que en E. invadens, estos cuerpos con-
sisten de pequeñas partículas (cerca de 200 Å en diámetro) --
arreglados en un patrón cristalino; y se encontraron eviden--
cias de que estas partículas están compuestas de unidades pe-
queñas.

Los cuerpos cromatoides han sido observados en los tro--
fozoitos de Entamoeba invadens, donde ellos son más pequeños
y más numerosos que en los quistes y en E. histolytica (4).

Barker y Swales (5) han encontrado que en E. histolytica
estos cuerpos contienen cantidades variables de DNA y RNA y -
han sido reconocidos como exceso de cromatina lanzada durante
la división, o como alimento de reserva.

Estudios histoquímicos muestran que los cuerpos cromatoides consisten solamente de ácido ribonucleico y algunas --
proteínas no específicas, mientras que el microscopio electró-
nico muestra que las partículas globulares que forman los --
cuerpos son aplanadas, después del tratamiento con ribonucle-
asa (4).

Se ha desarrollado un proceso de fraccionamiento el cual
utiliza ácido ascórbico como un antioxidante y variaciones en
la concentración de magnesio para controlar el estado de agre-
gación de las partículas que contienen RNA.

Este proceso fue usado para obtener ribosomas libres y partículas de los cuerpos cromatoides. La tinción negativa de las fracciones particuladas revelan una diversidad de tamaño de partícula, que varía de 150 - 660 Å en diámetro. Esta diversidad de tamaño se muestra debido a la agregación en diferentes combinaciones de 2 partículas "como-ribosomas" de 150 y 250 Å. Los anteriores resultados suponen la hipótesis que -- los cuerpos cromatoides representan un estado cristalino de -- ribosomas y son incompatibles con una interpretación viral -- como el origen de estos cuerpos (3).

En un estudio sobre la comparación de la estructura y -- función de ribosomas polisomales y de estructuras helicoidales de E. invadens por medio de gradientes de sacarosa, se encontró que los ribosomas de los trofozoitos y quistes fueron activos para sintetizar proteínas en sistemas libres de células, aunque la actividad en extractos de quistes requirió la adición de la fracción soluble de trofozoitos (17). Se menciona asimismo que los ribosomas de polisomas y estructuras helicoidales de E. invadens son probablemente idénticos en función y que la capacidad para formar hélices es una propiedad intrínseca de los ribosomas libres de este organismo (16).

Por otra parte en células enquistadas del cuerpo fructífero de Acrasis rosea fué encontrada una estructura llamada "elemento lamelar" (25), esta estructura que puede ser - - -

sencilla o apilada de hasta 12 elementos, son capas de gránulos "como-ribosomas". Ensayos histoquímicos indican que los gránulos en las lamelas son ribosomas o precursores de ribosomas.

Behnke (6), describe que el arreglo helicoidal de ribosomas durante la diferenciación de células del intestino delgado de embrión de rata, es muy similar a las estructuras encontradas en células musculares de los somitas de la cola del embrión de Rana pipiens, en la etapa 22 de su diferenciación (32).

Barker y Swales (5), presentaron evidencias acerca de cambios bioquímicos y físicos que tienen lugar en los ribosomas en el enquistamiento de Entamoeba sp. observando que son similares a los cambios observados en aquellos oocitos de lagartijo y embriones de pollo en donde se forman microcristales de ribosomas. Byers (7), ha mostrado que las características de los cuerpos cromatoides de Entamoeba son similares a los microcristales de ribonucleoproteínas en oocitos de lagartijo y en embriones de pollo crecidos en hipotermia. En este último caso, Morimoto, Blobel y Sabatini (24) encontraron que el arreglo básico del cristal es un tetrámero, el cual no está asociado a mensajeros. Se indica además que los tetrámeros se forman a partir de monosomas liberados de polisomas y la posibilidad de que los tetrámeros se puedan formar de ribosomas no programados para la síntesis de proteínas, - - - -

sintetizadas inmediatamente antes de la cristalización o durante el congelamiento.

En otro trabajo realizado por Kusammrarn y col. (16), se informó que los cuerpos cromatoides formados por agregados de ribosomas conformados en hélices, aparecían en quistes y en trofozoitos de E. invadens con lento crecimiento, pero un agregado similar de hélices, fueron formadas abundantemente en trofozoitos con crecimiento activo tratados con inhibidores de síntesis de proteínas.

En un trabajo posterior Kusammrarn y col. (17) concluyen que los cuerpos cromatoides se forman a partir de ribosomas libres solamente cuando es reprimida la síntesis de proteínas, es decir, cuando las células están en un estado de crecimiento lento o nulo.

Sin embargo, Ramos. (27), demuestra la presencia de cuerpos cromatoides en células con crecimiento activo cuando éstas crecen a tensiones altas de CO₂, lo cual implica que, aunque exista una activa síntesis de proteínas, es posible la formación de cuerpos cromatoides en condiciones especiales de cultivo.

Por otra parte, es característico de algunos sistemas de diferenciación que gran número de ribosomas son sintetizados, acumulados y mantenidos inactivos hasta el disparo de las ---

primeras fases del desarrollo lo cual permite un rápido crecimiento al inicio de la diferenciación (10).

Existe entonces la posibilidad de que en E. invadens la formación de cuerpos cromatoides no sea solamente un evento, sin significado biológico originado por agregación de ribosomas ociosos como lo sugieren Kusamrarn y col. (17), sino más bien una estrategia biológica que facilite la proliferación celular después de la germinación del quiste.

Por otra parte Lu Chang (9) encontró que existe una estrecha relación entre el potencial óxido-reducción del cultivo y el crecimiento, enquistamiento y desenquistamiento de E. histolytica y menciona también que la relación entre el potencial de óxido-reducción y el pH es crítica para inducir el enquistamiento. Esto nos sugiere que cuando los trofozoitos

de E. invadens crecen bajo alta tensión de CO₂ en el medio TP-S-1, se encuentra bajo la influencia de alguno de los factores que dispara alguno o varios de los eventos (en este caso la formación de cuerpos cromatoides) involucrados en la formación del quiste, pero asimismo sugiere también que además se requieren de otros factores para la inducción y formación del quiste maduro.

Los anteriores antecedentes muestran que cuando Entamoeba crece en medios que difieren en algún factor, estas diferencias pueden inducir cambios en su crecimiento y en su

estructura fina. En este trabajo se dá evidencia de la presencia generalizada de cuerpos cromatoides de trofozoitos de E. invadens que crecen activamente con alta tensión de CO₂.

Los resultados de la primera parte de este trabajo (presencia de cuerpos cromatoides en trofozoitos crecidos con alta tensión de CO₂) y el hecho de que los cuerpos cromatoides son estructuras invariablemente presentes en el quiste nos hizo suponer que la alta tensión de CO₂, factor inductor de los cuerpos cromatoides, representa uno de varios posibles factores necesarios para inducir enquistamiento y además una alta posibilidad de que el ayuno de glucosa completara los requisitos necesarios para inducir tal proceso, dados los antecedentes del medio AEM de enquistamiento publicados por Rengpien y Bailey (28) y el LG-medio de Vazquezdelara, Cisneros y Arroyo Begovich (12) en los que el ayuno de glucosa es un factor de inducción de tal proceso.

En base a los anteriores antecedentes nos planteamos las hipótesis dadas a continuación.

III. HIPOTESIS

OS

1.- La alta tensión de CO₂ en medio de cultivo axénico, induce la formación de cuerpos cromatoides en trofozoitos de Entamoeba invadens durante su crecimiento activo

2.- La carencia de glucosa y alta tensión de CO₂ en el medio de cultivo, inducen el enquistamiento de

E. invadens.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

En base a las dos anteriores hipótesis trabajamos hacia los siguientes objetivos:

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

IV. OBJETIVOS

1.- Determinar la presencia de cuerpos cromatoides durante la fase de crecimiento de trofozoitos de Entamoeba invadens que crecen axénicamente con alta tensión de CO₂.

2.- Determinar la influencia de la alta tensión

de CO₂ y carencia de glucosa en el medio TP-S-1 en la posible inducción del enquistamiento de Entamoeba invadens.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

V. MATERIALES

A.- Origen de los reactivos

Obtuvimos de Productos Químicos Monterrey, S.A.: hidróxi-
do de sodio, acetato de uranilo, fosfato monobásico de po-
tasio y fosfato dibásico de potasio; de Merck de México,-
S.A.: alcohol etílico, citrato de plomo, peptona de ca-
seína, L- cisteína, ácido ascórbico y azul de toluidina;
de Técnica Química, S.A. de México: cloruro de sodio y --
glucosa anhidra; de Ted Pella, Inc. Calif, U.S.A.: resina
medcalf, óxido de propileno y glutaraldehído; de Farma--
céuticos Lakeside, S.A. de C.V.: penicilina-G sódica cris-
talina y sulfato de estreptomina; de Paines & Byrne --
LTD. Greenford, Inglaterra: panmede; de Sigma Chemical --
Company, U.S.A.: calcofluor M2R y tritón X 100; de Infra
del Norte: CO₂.

B.- Material biológico

Cepa amibiana.

Utilizamos la cepa IP-1 de Entamoeba invadens proporcio-
nada por el Laboratorio de Amibiasis Experimental y Bio-
logía Celular de la Unidad de Investigación del Noreste
(I.M.S.S.)

Suero de bovino inactivado.

El suero fué donado por el Dr. Salvador Saíd F. del Laboratorio de Biología Celular y por el Biol.M.C. Carlos Leal G. del Laboratorio de Genética, ambos de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste (I.M.S.S.)

C.- Preparación del medio de cultivo TP-S-1 de Diamond (sin vitaminas)

COMPONENTES	CONCENTRACION (g/500 ml H ₂ O)
Peptona de caseína	5.0
Panmede	10.0
D-glucosa anhidra	2.5
L-cisteína	0.5
Acido ascórbico	0.1
NaCl	2.5
KH ₂ PO ₄	0.3
K ₂ HPO ₄	0.5

Los componentes se mezclaron y disolvieron en 60 ml de agua tridestilada en ebullición. Se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos.

Se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos. Se aforó el sobrenadante a 500 ml con agua tridestilada estéril y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N. Se distribuyó en alícuotas de 9 ml en tubos de cultivo de 15 X 100 mm con tapón de hule y se esterilizaron a 15 lb/pulg²/15 min. Se almacenaron en la obscuridad a temperatura ambiente hasta su utilización. No se utilizó medio de cultivo con más de dos semanas después de su preparación.

Antes de ser inoculados, los tubos se complementaron con 1 ml de suero estéril inactivado de bovino y 0.1 ml de la solución de trabajo de penicilina-estreptomina (1000 X).

D.- Preparación de la solución salina de fosfatos (PBS)

NaCl	-----	6.5 g
K ₂ HPO ₄	-----	2.8 g
KH ₂ PO ₄	-----	0.4 g

Se disolvieron los componentes en aproximadamente 700 ml de agua tridestilada y se aforó a 1000 ml, se ajustó el pH a 7.4-7.5 con NaOH 10 N.

La solución se fraccionó en frascos con 100 ml y se esterilizaron por 15 minutos a 15 lb/pulg².

E.- Preparación de la solución de penicilina - estreptomicina
(19)

- Solución concentrada de penicilina: a un frasco ampula de 1;000,000 de unidades de penicilina-G sódica cristalina, se le inyectaron con jeringa y aguja estériles, 5 ml de - agua tridestilada estéril para disolver la penicilina,

- Solución patrón de penicilina-estreptomicina: A un frasco ampula de sulfato de estreptomicina, se le añadió bajo condiciones de esterilidad, la solución concentrada de -- penicilina y se mezclaron.

- Solución de trabajo de penicilina-estreptomicina (1000 X). Se pasó asépticamente toda la solución patrón de penicilina-estreptomicina del frasco ampula a una probeta estéril de 25 ml y se aforó a 20 ml con agua tridestilada estéril. Se guardaron alícuotas de 5 ml en tubos con tapón de rosca de 13X100 mm, etiquetados con la fecha de -- preparación y se almacenaron a -20°C cubiertos con papel aluminio. ®

F.- Preparación de hidróxido de sodio 10N

Se preparó disolviendo 40 g de NaOH aforando a 100 ml. -- con agua destilada estéril.

G.- Obtención y almacenamiento del agua tridestilada y esterilizada

Agua destilada electropura, se destiló nuevamente dos veces en un destilador de vidrio. El agua tridestilada se fraccionó en matraces iguales, los cuales se esterilizaron inmediatamente a 15 lb/15 min y se etiquetaron con la fecha de esterilización.

H.- Preparación de glutaraldehído al 2%

0.2 g de glutaraldehído en 100 ml de amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.2

I.- Preparación de resina epoxi medcalf

Mezcla A

Resina ----- 80 g

DDSA ----- 105.6 g

Mezcla B

Resina ----- 100 g

NMA ----- 88.3g

Mezcla final para incluir:

A ----- 5 g

B ----- 5 g

catalizador . 0.14 g (DMP 30)

J.- Preparación de acetato de uranilo

Solución saturada en agua destilada.

K.- Preparación de citrato de plomo

Se disuelven 0.03 g de citrato de plomo en 10 ml de agua destilada hervida y fría y se agregan 2 a 3 gotas de NaOH 10N. Se guarda en refrigeración en recipientes oscuros.

L.- Preparación de azul de toluidina

Se disuelve 1 g de borato de sodio en 100 ml de agua destilada en ebullición y se agregan 0.5g de azul de toluidina hasta disolver completamente. Filtrar y usar.

M.- Buffer de fosfatos 0.2M, pH 7.2

- Solución A:

K_2HPO_4 ----- 31.53 g en 1000 ml de agua destilada.

- Solución B:

KH_2PO_4 ----- 34.90 g en 1000 ml de agua destilada.

Se utilizaron 216.92 ml de solución A para 347 ml de la solución B, dando un volumen final de 563.92 ml.

N.- Preparación de calcofluor M2R al 1%

1 g de calcofluor M2R se disolvió en agua destilada y se aforó a 100 ml.

O.- Preparación de tritón X-100 al 1%

1 ml de tritón X100 se disolvió en agua destilada y se aforó a 100 ml.

VI. METODOLOGIA

A.- Mantenimiento de la cepa

La cepa de Entamoeba invadens se mantiene en medio TP-S-1 a través de resiembras sucesivas, antes de alcanzar su fase estacionaria.

B.- Cinética de crecimiento normal

Se enfrió el tubo fuente de inóculo a 0-4°C durante 15-20 minutos y se determinó el número de células por mililitro de medio. Se dispusieron series de 11 tubos conteniendo cada uno 10 mililitros de medio TP-S-1 más 0.1 ml. de solución de antibióticos de penicilina-estreptomina y se inocularon con 4×10^3 células por mililitro de medio, se incubaron a 25°C y se realizaron cuentas cada 24 h para determinar el incremento de células. Cada punto representa el promedio del valor de dos tubos.

C.- Determinación de la densidad celular

Para determinar el número de células (trofozoitos), los tubos se enfriaron por 15-20 minutos a 4°C para despegar las células adheridas a las paredes, se homogenizaron cuidadosamente por inversión y se contaron las células mediante una cámara hematocitométrica de Neubauer.

D.- Cinética de crecimiento con alta tensión de CO₂

El procedimiento fué igual que para la cinética de crecimiento normal con la única diferencia de que antes de ser incubados, cada tubo fué gaseado con CO₂ como se describe enseguida.

E.- Gaseo de los tubos con CO₂ (Alta tensión de CO₂)

Los tubos fueron cerrados con un tapón de hule atravezado con 2 agujas, la más larga unida a una jeringa (sin émbolo) con un filtro de algodón y la otra a una manguera de plástico también con filtro de algodón, todo ello estéril (véase fig. 1). El gas se hizo burbujear en el medio a través de la jeringa la cual se conectó a la fuente de gas (tanque de CO₂). El flujo de CO₂ fué de 0.2 l/min/ 2 min. Luego fueron retiradas las 2 agujas y rápidamente sellado el tapón con vaselina para evitar posible paso de gases a través de los orificios dejados por las agujas.

F.- Crecimiento de trofozoitos con alta tensión de CO₂ para observación en microscopía

Se utilizó un inóculo de 4×10^3 células por mililitro de Entamoeba invadens y fueron crecidas en cultivo axénico en 10 ml de medio TP-S-1 con 0.1 ml de antibióticos. Los tubos fueron luego gaseados con CO₂ como se ha descrito. Se incubaron a 25°C durante 1 a 10 días y las

pastilla de células fueron obtenidas y procesadas para su observación en el microscopio electrónico.

G.- Inducción del enquistamiento con alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa

Se dispuso una serie de tubos con 10 ml de medio TP-S-1 más 0.1 ml de la solución penicilina-estreptomicina y se inocularon con $4-10 \times 10^3$ células por mililitro, fueron gaseadas con CO₂ y se incubaron a 25°C por 4-6 días. Los tubos se enfriaron a 0°C durante 12 min y se centrifugaron a 1500 rpm por 2 min. Se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS. Se agregó a los tubos 10 ml de medio TP-S-1 sin glucosa y 0.1 ml de solución de antibióticos y nuevamente se gasearon como ya ha sido descrito. Los tubos se incubaron a 25°C durante 60 h.

H.- Observación con microscopía de fluorescencia

Quistes obtenidos, después de incubar trofozoitos por 60 h en medio sin glucosa y con alta tensión de CO₂ fueron lavados con PBS, tratados con tritón X-100 por 15-min, lavados con H₂O destilada y resuspendidos en PBS. Una gota de esta muestra fué colocada sobre un portaobjetos y sobre ella se agregó una gota de calcofluor M2R al 1% y se observó con luz U.V. con un microscopio Zeiss de fluorescencia.

I.- Microscopía electrónica de barrido

Las muestras en medio TP-S-1 sin glucosa con CO_2 fueron centrifugadas a 1500 rpm/15 min y lavadas 2 veces con PBS para después ser fijadas con glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfatos durante 24 h a 4°C, luego se lavaron con PBS y se deshidrataron con etanol 50, 70, 90 y 100%, 10 min en cada uno de ellos. Las muestras fueron colocadas sobre cubreobjetos de 5 mm de lado y se pasaron a una canastilla para introducir las a un desecador crítico CPA II-Technic durante 15 min a 10°C. Los cubreobjetos fueron luego colocados sobre portamuestras de bronce, utilizando cinta de doble pegamento. Las muestras fueron cubiertas con oro en un recubridor de capa fina Jeol JFC-1100, a una velocidad de depósito de 350 Å a 15-20 Kv durante 3 min.

Las muestras fueron posteriormente examinadas en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-35C operado a 10-15 Kv. Se tomaron fotomicrografías utilizando películas Kodak Vp-120.

J.- Microscopía electrónica de transmisión

Los tubos fueron enfriados a 0°C por 20 min y centrifugados a 1000 rpm/5 min. La pastilla se lavó 2 veces con PBS y se fijó con glutaraldehído al 2% en buffer de fosfatos por 24 h a 4°C. Se centrifugó y se lavó con --

solución PBS, luego se deshidrató en alcoholes al 60, 70, 80, 90 y 100% por 15 min en cada uno, repitiendo una vez en los últimos.

Se agregó óxido de propileno y resina medcalf en relación 1:1 por 3 h a temperatura ambiente. Se incluyó en resina medcalf y polimerizó a 65°C por 24 h. Cortes finos teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo fueron analizados en un microscopio electrónico EM-10.

K.- Prueba de viabilidad de quistes

Los cultivos fueron lavados con PBS estéril y tratados con tritón X-100 al 1% estéril por 20 min. Nuevamente se lavaron con PBS estéril (3 veces) y fueron resembrados en medio TP-S-1 e incubados a 25°C.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



VII. RESULTADOS Y DISCUSION

A.- Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento de Entamoeba invadens - - IP-1 en medio TP-S-1 modificado, se inició con un inóculo de un cultivo en fase logarítmica, mostró una inmediata - fase-log con ausencia de fase de recuperación al inicio - de la misma (figura 2, curva A) lo cual demuestra el buen estado fisiológico de las células en los cultivos. Cuando se inició con diferentes cantidades de inóculo, las -- curvas obtenidas (no mostradas) dieron pendientes y rendi- mientos semejantes. Cuando la cinética se realizó en las mismas condiciones pero además con alta tensión de CO₂ -- (figura 2, curva B) la pendiente de esta curva fué seme- jante a la obtenida con tensión normal de CO₂, lo cual in- dica que no hay diferencia en la velocidad de crecimiento. El rendimiento celular fué también semejante.

B:- Inducción de cuerpos cromatoides con alta tensión de CO₂

Cuando los trofozoitos crecidos en alta tensión de - CO₂ fueron analizados en cortes finos y semifinos durante 1 a 10 días de cultivo, fueron evidentes la presencia de cuerpos cromatoides en el 30-40% de las células observa-- das. El porcentaje real de la presencia de cuerpos cromatoides debe ser mayor al calculado dado que seguramente - en cierto número de células el nivel del corte no permi--

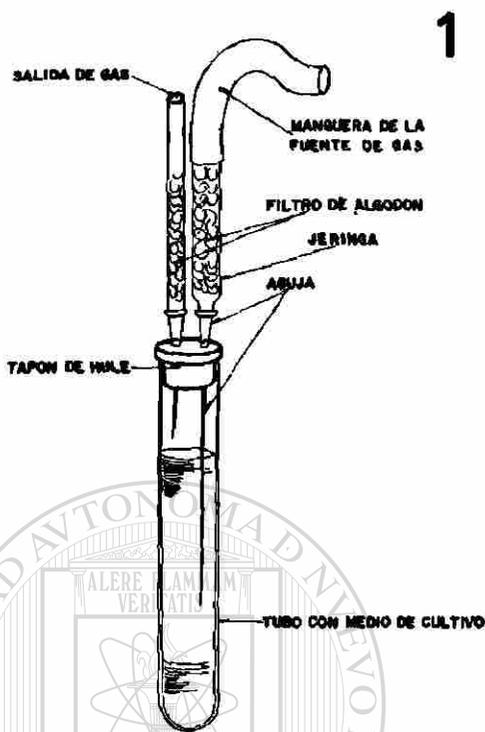


FIG. 1.- APARATO UTILIZADO PARA GASEAR LOS CULTIVOS CON CO₂.

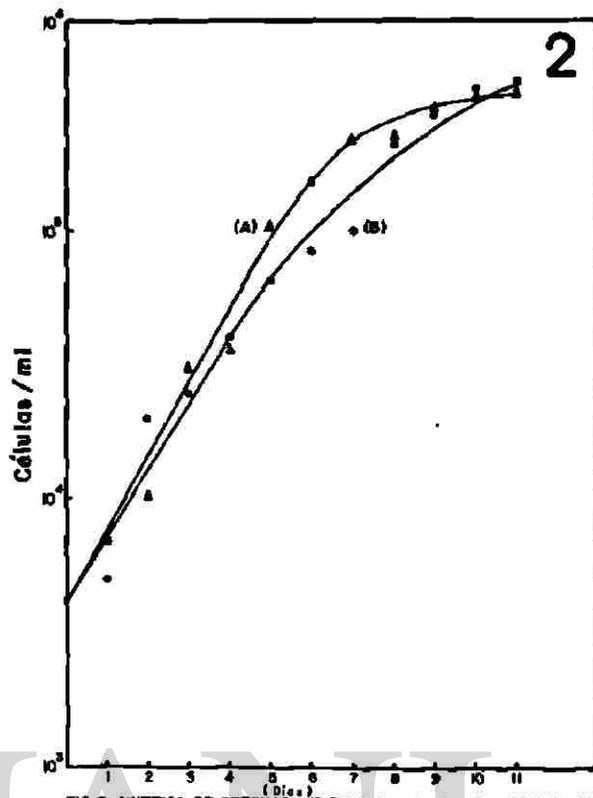


FIG. 2.- CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Entamoeba invadens* IP-1 EN MEDIO TP-S-1. CURVA A (▲) CON TENSIÓN NORMAL DE CO₂, CURVA B (●) CON ALTA TENSIÓN DE CO₂.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fig. 1 Aparato utilizado para gasear los cultivos con CO₂.

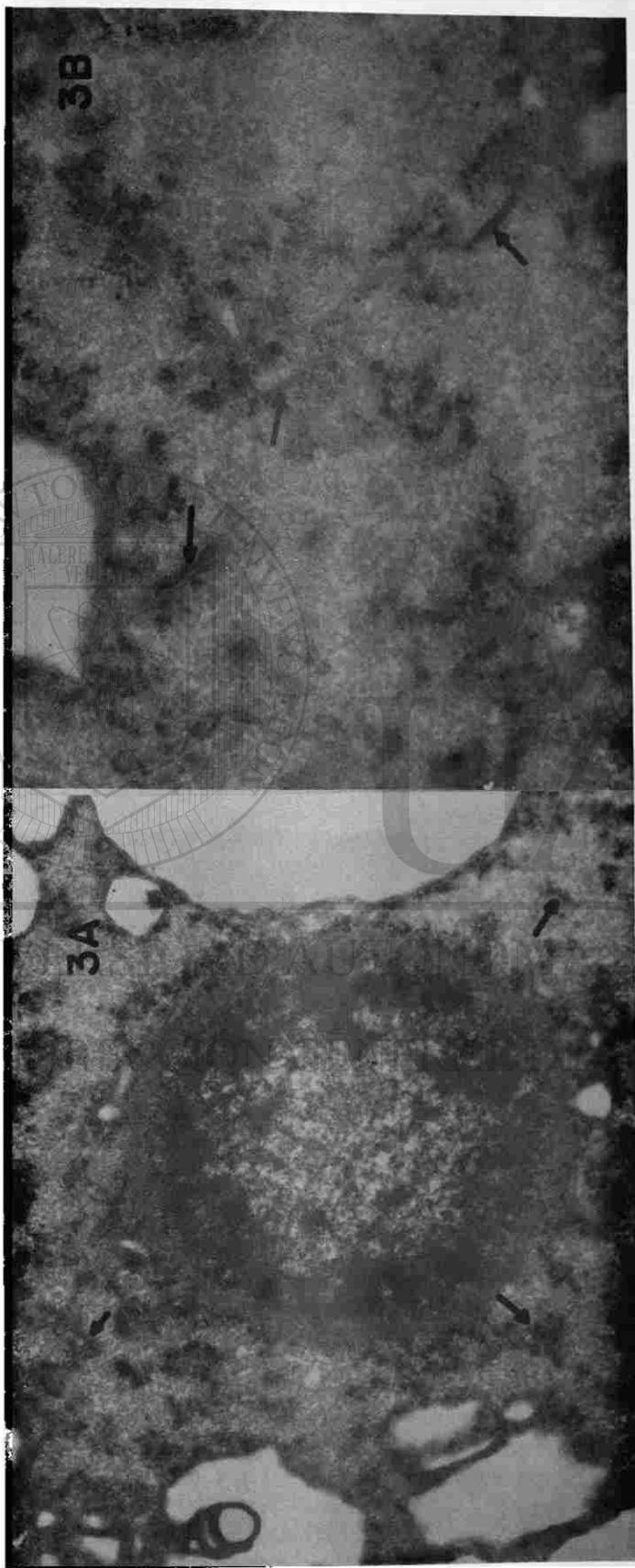
Fig. 2 Cinéticas de crecimiento de *Entamoeba invadens* IP-1 en medio TP-S-1. Curva A (▲) con tensión normal de CO₂, - - curva B (●) con alta tensión de CO₂.

tió la observación de tales estructuras.

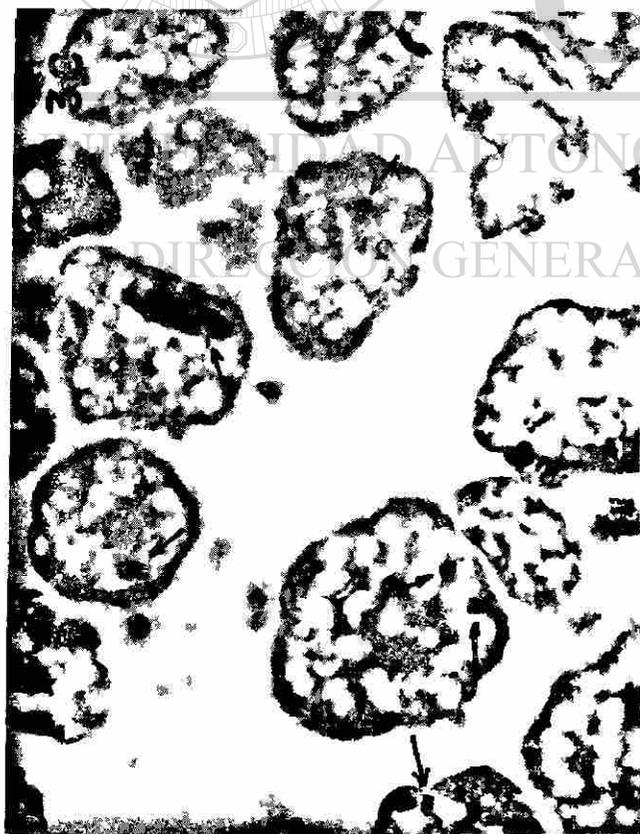
Las figuras 3A y 3B muestran cortes finos de células con 1 y 2 días de crecimiento respectivamente donde se puede observar que en las del primer día, presentan pequeños agregados con apariencia de ribosomas sin llegar a formar las típicas estructuras ribosomales helicoidales, en las del segundo día estas estructuras son evidentes.

Las figuras 3C, 3D y 3E muestran cortes de células con 3, 4 y 5 días de crecimiento respectivamente (fase-log) donde los cuerpos cromatoides ya son evidentes. La figura 3D es de un trofozoito con 4 días en cultivo y las figuras 3C y 3E muestran cortes semifinos de células con 3 y 5 días de crecimiento. La figura 3F es un corte semifino que muestra la presencia de cuerpos cromatoides en trofozoitos con 10 días de crecimiento (inicio de la fase estacionaria). La figura 3G muestra la ultraestructura en sección longitudinal de un cuerpo cromatoide con 4 días en cultivo, donde claramente puede apreciarse la agregación lateral característica de las hélices ribonucleoprotéicas. La figura 4 es un testigo donde se muestra la ausencia de agregados y hélices ribosomales.

Los anteriores hallazgos están en desacuerdo con lo propuesto por Kusammararn y col (17) quienes han concluido que los cuerpos cromatoides se forman a partir de riboso-



Figs. 3A y 3B. Micrografía electrónica de trofozoitos de *E. invadens* al inicio de la fase-log, crecidos con alta tensión de CO_2 . Las figuras 3A y 3B muestran respectivamente cortes finos de células con 1 y 2 días de crecimiento. Nótese - que en el primer día, se observan pequeños agregados con apariencia de ribosomas (flechas), sin llegar a formas típicas estructuras helicoidales. Al segundo día, las estructuras ribosomales helicoidales son evidentes (flechas). - - - - (3A) 12,000 X, (3B) 20,000 X.



Figs. 3C, 3D y 3E. Presencia y ultraestructura de cuerpos cromatóides en trofozoitos de *E. invadens* en fase log crecidos con alta tensión de CO_2 . Las figs. 3C, 3D y 3E muestran respectivamente cortes de células con 3, 4 y 5 días de crecimiento. Los cuerpos cromatóides son evidentes (flechas). La fig. 3D es una micrografía electrónica y las figs. 3C y 3E son cortes semifinos al microscopio óptico. (3C y 3E) 1,200 X; (3D) 4,400 X.

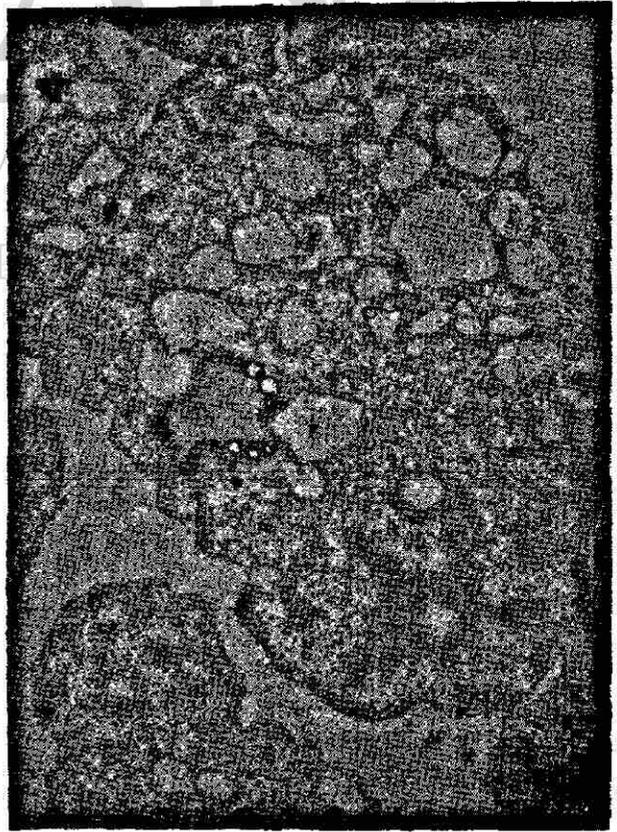
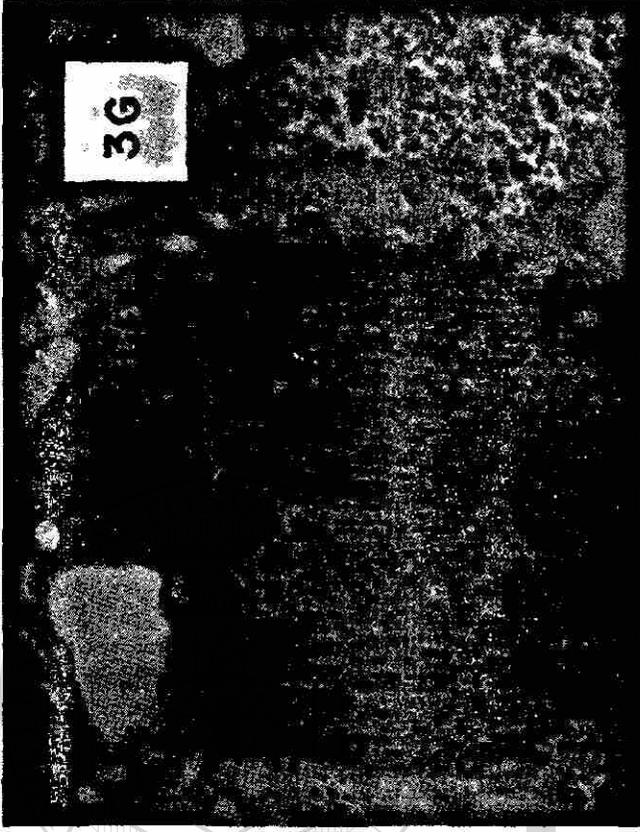
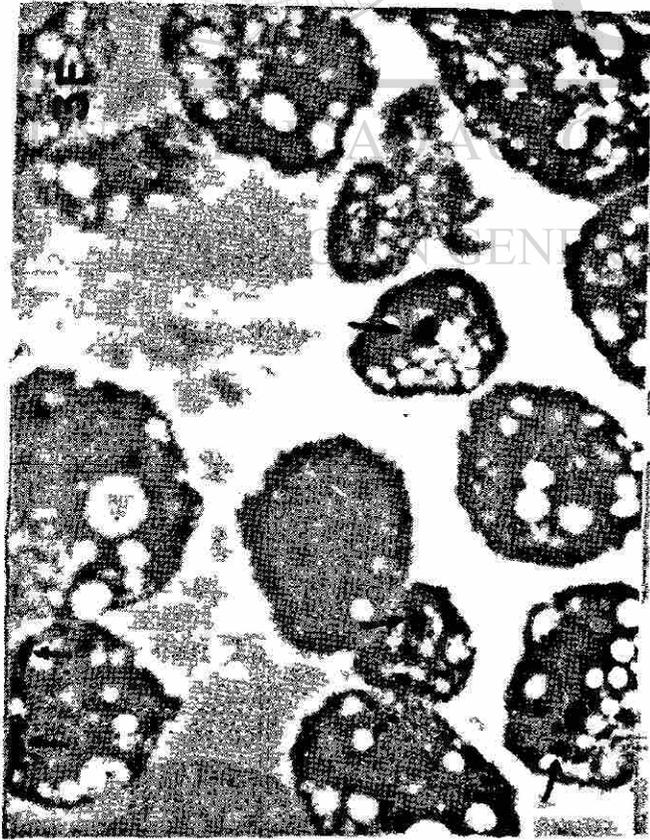


Fig. 3F. Corte semifino que muestra la presencia de cuerpos cromatoides (flechas) en trofozoitos de *E. invadens* con 10 días de crecimiento (inicio de fase estacionaria) con alta tensión de CO_2 . 1200 X.

Fig. 3G. Ultraestructura en sección longitudinal de un cuerpo cromatoides de un trofozoito con 4 días en cultivo con alta tensión de CO_2 . 20,000 X.

Fig. 4. Micrografía electrónica de un trofozoito testigo con cuatro días en cultivo (mitad de la fase-log) crecido con tensión normal de CO_2 . Nótese la ausencia de cuerpos cromatoides. 3,000 X.

mas libres solamente cuando es reprimida la síntesis de proteínas, es decir cuando las células están en estado de crecimiento lento o nulo. Sin embargo, los presentes resultados muestran la formación de cuerpos cromatoides en células con crecimiento activo (fase-log), lo cual implica que bajo estas condiciones (crecidas en alta tensión de CO₂) es posible la formación de cuerpos cromatoides si multáneamente con una activa síntesis de proteínas. Esto hace suponer que el fenómeno de agregación de ribosomas libres implica no solamente un evento espontáneo sin significado biológico sino más bien el resultado de la existencia de un mecanismo estratégico de acumulación de reservas ribosomales (aún durante las síntesis activa de proteínas) para un inminente proceso de diferenciación y su utilización inmediata en el subsiguiente desenquistamiento.

Los anteriores resultados nos llevaron a pensar que nuestras condiciones de cultivo (alta tensión de CO₂) son responsables de la inducción de cuerpos cromatoides y que representan uno de los posibles varios factores inductores del enquistamiento. Por otra parte, el hecho conocido de que los cuerpos cromatoides son estructuras que invariablemente están asociadas con la formación del quiste y que la omisión de glucosa del medio de cultivo es, entre otras, una condición necesaria para la inducción del en-

quistamiento in vitro (13, 29) pensamos que la eliminación de la glucosa del medio TP-S-1 con alta tensión de CO_2 podría completar los requerimientos para la formación del quiste viable. Para probar esta hipótesis procedimos a sembrar trofozoitos en medio TP-S-1 con alta tensión de CO_2 en ausencia de glucosa como se describe en material y métodos.

C.- Inducción de enquistamiento

La inducción del enquistamiento mediante el procedimiento descrito en material y métodos dió como resultado la formación de cuerpos redondeados con la apariencia de quistes maduros cuando fueron observados por microscopía de contraste de fase (fig. 5).

El rendimiento de estas formas quísticas varió entre 70-90% y se alcanzó a las 60 h después de que las células fueron colocadas en medio TP-S-1 sin glucosa y con alta tensión de CO_2 .

D.- Caracterización del quiste

La demostración de que las formas quísticas formadas en TP-S-1 con alta tensión de CO_2 y ayuno de glucosa son

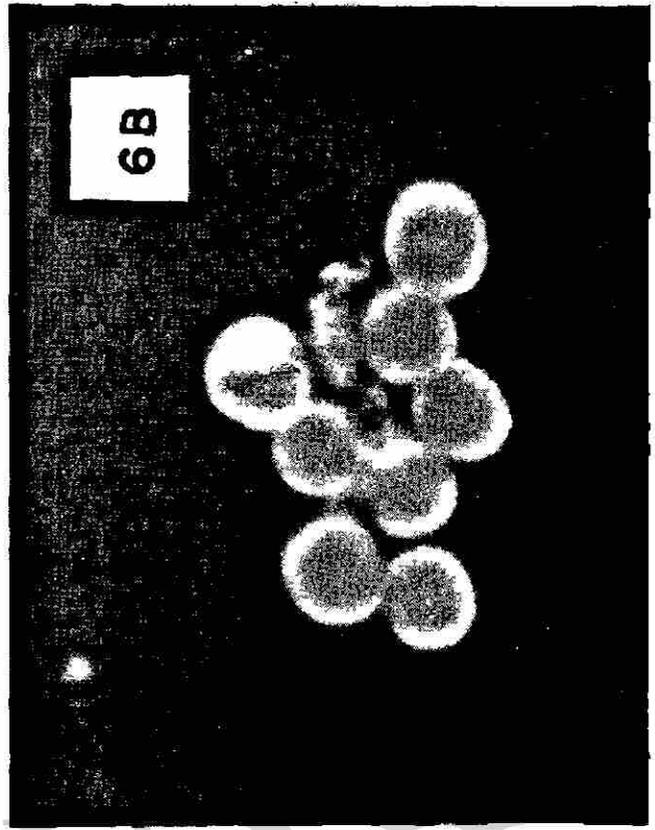
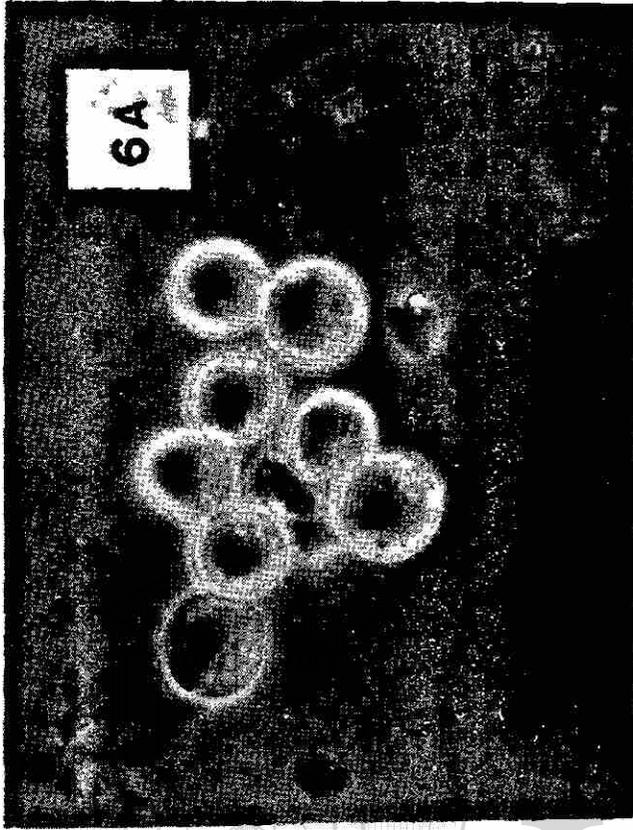
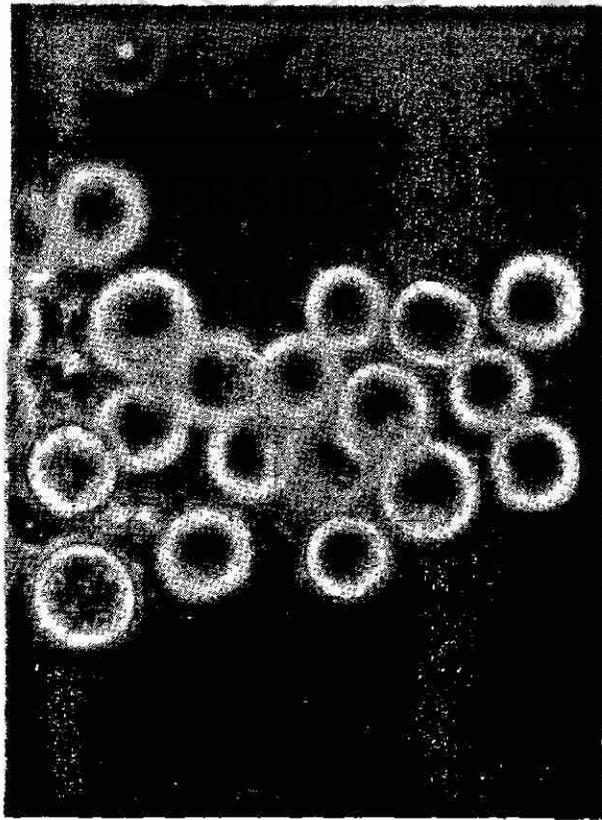


Fig. 5. Formas quísticas de E. invadens inducidas por alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa, observadas por microscopía de contraste de fase. 1,200 X.

Figs. 6A-6B. Evidencia de la afinidad del calcofluor M2R por la superficie de las formas quísticas de E. invadens. Las figuras 6A y 6B representan el mismo campo observado respectivamente por microscopía de contraste de fase y microscopía de fluorescencia luego que la muestra fué tratada con calcofluor M2R. (6A) 1,200 X, (6B) 1,200 X.

quistes maduros y viables, se determinó mediante los siguientes criterios:

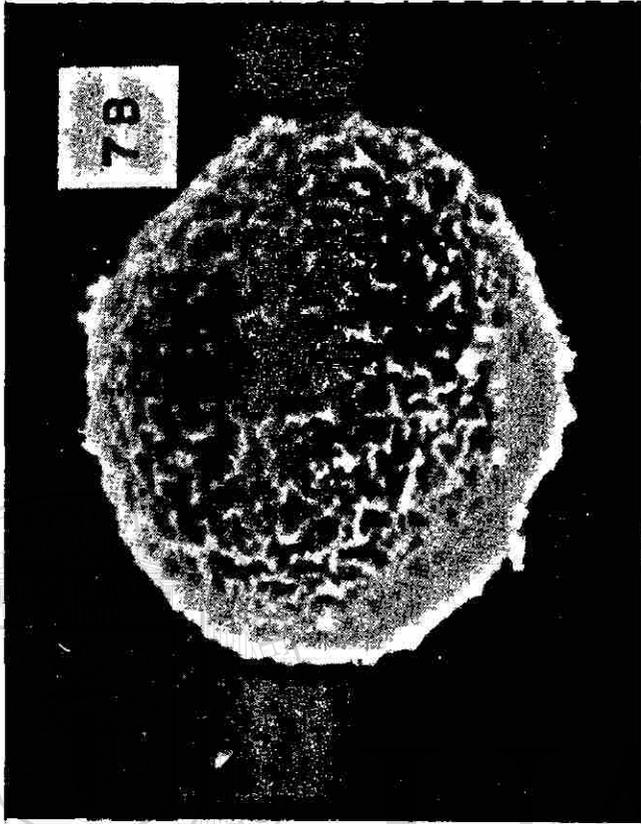
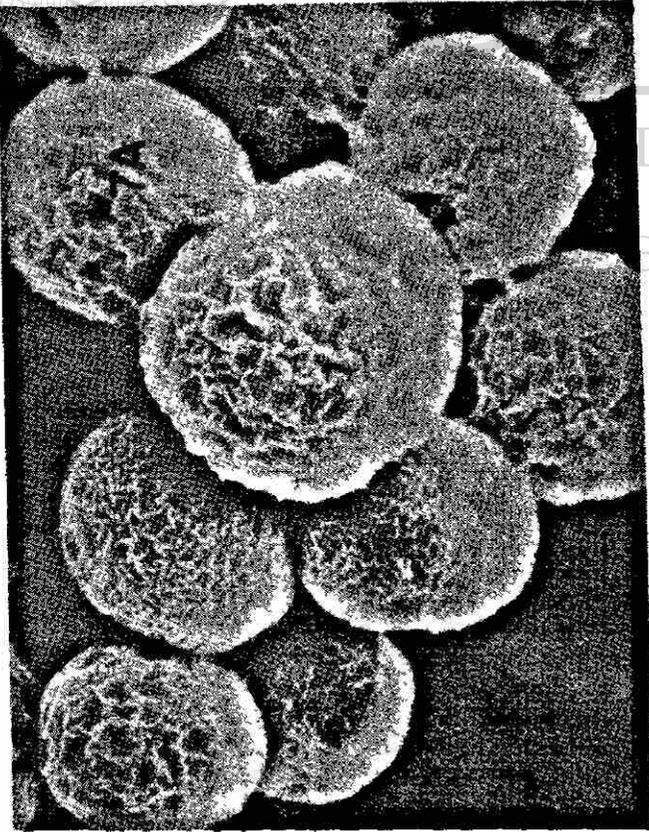
a) Cuando las formas quísticas fueron tratadas con clorofluor y observadas con U.V. una intensa fluorescencia fué observada en la superficie lo cual demuestra la presencia de polímeros de glucosa (pared), (figs. 6A y 6B)

b) La observación de las formas quísticas al microscopio de barrido demostró una apariencia de la superficie de la pared igual a la que presentan los quistes obtenidos en AEM, (figs. 7a y 7B).

c) La microscopía de transmisión demostró que las formas quísticas son multinucleadas y con grandes cuerpos cromatoides (figs. 8a y 8B).

d) Las pruebas de viabilidad (véase material y métodos) dieron como resultado que a los 3 días de cultivo, abundantes trofozoitos fueron observados y una nueva población fué formada a partir de los mismos.

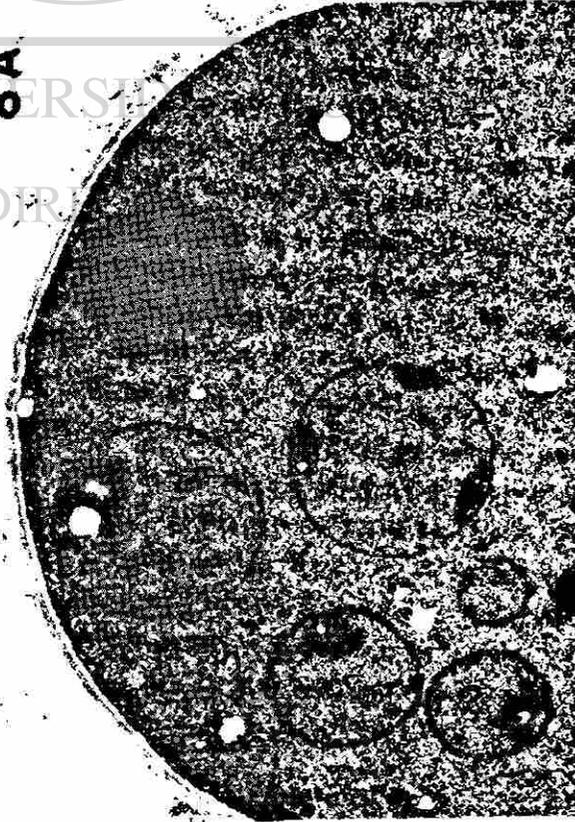
Ante las evidencias anteriores pudimos concluir que las formas quísticas obtenidas mediante la metodología descrita son quistes maduros y además viables.



Figs. 7A-7B. Micrografías obtenidas por microscopía de barrido de quistes formados: (7A) En medio AEM y (7B) con alta tensión de CO_2 y ayuno de glucosa. (7A) 4,000 X; (7B) 3,600 X.



8B



8A

Figs. 8A y 8B. Micrografías electrónicas de transmisión de quistes obtenidos con alta tensión de CO_2 y ayuno de glucosa. (8A) Quiste de *E. invadens* donde se aprecian 5 núcleos, un cuerpo cromatóide y la cromatina condensada en grandes grumos, típico de núcleos de quistes obtenidos con el medio AEM. (8B) Anpliación de la anterior en la región del cuerpo cromatóide en sección transversal, parte de dos núcleos con la cromatina condensada (flechas gruesas) y una sección de la pared (flecha delgada) son evidentes. (8A) 4,300 X, --- (8B) 19,500 X.

E.- Ventajas del método

La Tabla 1 muestra un resumen de los requerimientos de los medios axénicos de enquistamiento hasta ahora descritos. En ésta se muestra que la metodología aquí presentada para inducir enquistamiento en trozofitos de Entamoeba invadens tiene la ventaja de que en ningún momento las células sufren cambios drásticos de algún factor, como sucede en el medio de Rengpien y Bailey (AEM) ampliamente usado (29), en el que hay una diferencia de aproximadamente 300 miliosmoles menos con respecto al medio de crecimiento TP-S-1 (tabla 1). Por otra parte, el mismo medio AEM requiere un período de maduración de un mes, lo que no es necesario con este nuevo método. El método descrito por Vazquezdelara Cisneros y Arroyo Begovich (12) de inducción del enquistamiento en Entamoeba invadens por eliminación de la glucosa del medio TYI-S-33 (13), requiere células en óptimas condiciones de crecimiento (fase-log), lo cual también es necesario en el medio AEM. En ambos métodos, células recién entradas en fase estacionaria no producen resultados eficientes. En el nuevo método aquí descrito la eficiencia se mantiene, aún partiendo de células entrando en fase estacionaria. Este comportamiento puede explicarse por el hecho de que después del primer gaseo con CO₂ (véase material y métodos) las células deben crecer de

TABLA 1

F.- COMPARACION ENTRE DISTINTOS METODOS DE ENQUISTAMIENTO DE
Entamoeba invadens

MEDIO	CEM ¹	AEM ²	LG ³	ALTA pCO ₂ G(-) ⁴
Condición	Acondicionamiento por bacterias	Maduración 1 mes	Remoción de glucosa	Remoción de glucosa alta tensión - CO ₂
Requisito de la célula				Crecimiento previo en alta tensión CO ₂
Estado óptimo de las células	Mitad de la fase log	Mitad de la fase log	Mitad de la fase log	Cualquier punto de la fase de crecimiento
Aparición de pared (primos quistes)	16-20 h	10-12 h	6 h	30 h
Tiempo para máximo rendimiento	40-48 h	30 h	12 h	50-60 h
Eficiencia Máxima %	50-80	70	70	80-90
Osmolaridad mOs/Kg	390	78	310	365
Cepa	IP-1, PZ	IP-1, PZ*	IP-1, PZ*	IP-1, PZ**

* Rendimiento variable

** No ensayado

1 Medio condicionado de enquistamiento

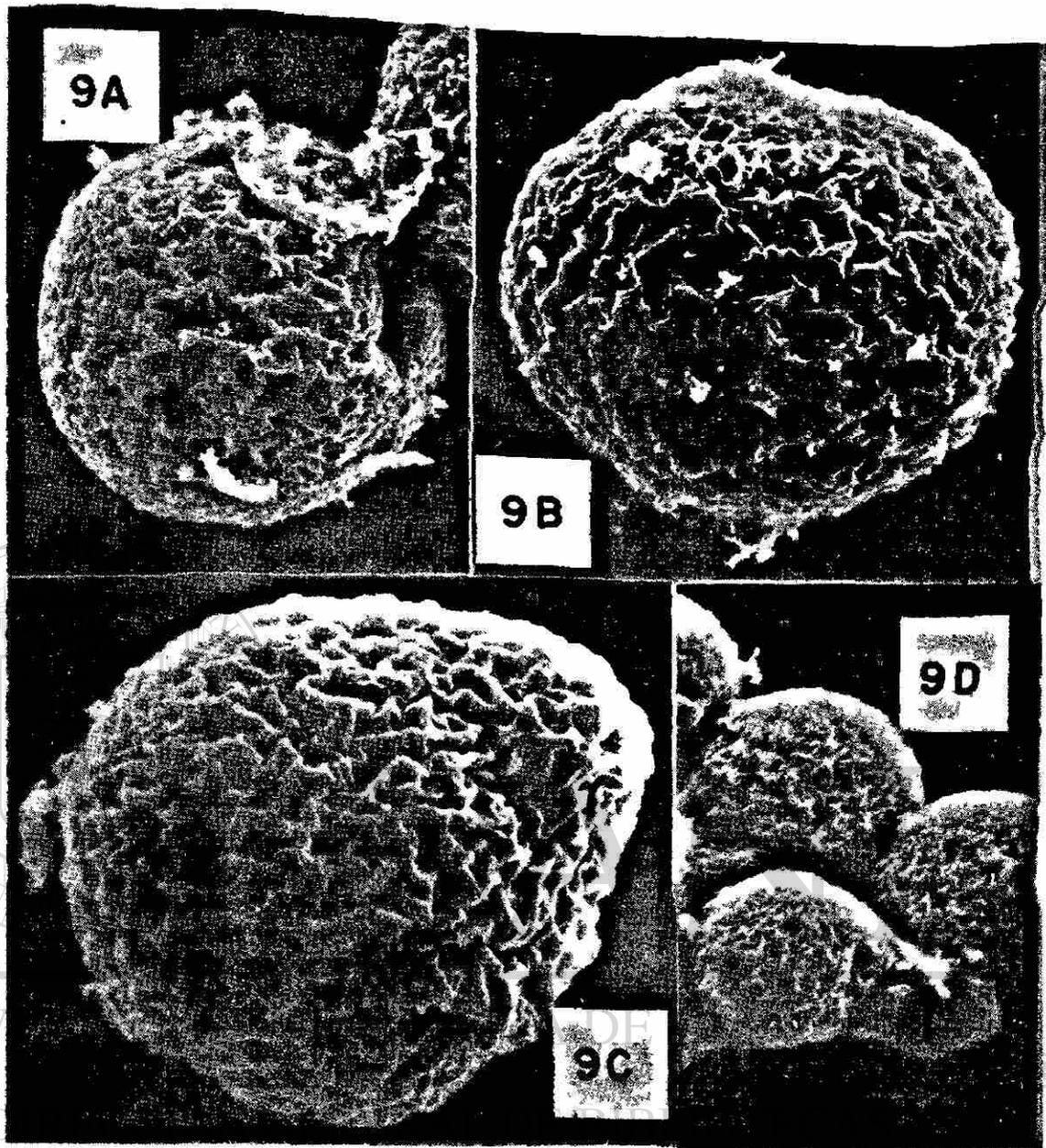
2 Medio de enquistamiento axénico

3 Medio con bajos niveles de glucosa

4 Alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa

4 a 6 días antes de ser colocadas en el medio sin glucosa y alta tensión de CO₂, tiempo en el que las células pueden entrar de nuevo a una fase-log.

En quistes con 60 o más h después de iniciado el enquistamiento aparentemente algunas células llegan a desenquistarse ya que al analizar en el microscopio de barrido quistes de estos tiempos pudimos observar una posible secuencia de eventos que sugieren fuertemente el desenquistamiento y cómo el trofozoito emerge del quiste a través de un poro en la pared (figs. 9A-9D). Esta interpretación se ve apoyada por la reciente descripción de la presencia de depresiones en la superficie de la pared de Entamoeba invadens como el posible sitio de salida del trofozoito (24), y un estudio con microfotografía espacial que ha descrito que el trofozoito deja el quiste a través de un poro en la pared (9) así como un estudio sobre desenquistamiento en E. histolytica en el que se ha demostrado que los trofozoitos emergen a través de un poro sobre la superficie celular cuando los quistes son colocados en un medio que estimula el crecimiento (32). Asimismo, en otros grupos de protozoarios, poros de emergencia han sido descrito para sus formas de resistencia (19, 34). Estos antecedentes nos permiten suponer que las prominencias de los quistes observados en las figuras 9B y 9C se inician en la depresión o cavidad del quiste y representan el sitio del futuro poro de salida del trofozoito.



Figs. 9A-9D. Micrografías de microscopio de barrido de trofozoitos de *E. invadens* con 60 o más horas con alta tensión de CO_2 y ayuno de glucosa. La sucesión de fotografías 9A a 9D muestran la posible secuencia de eventos morfológicos en el desenquistamiento. (9A) Quiste de *E. invadens* con una clara cavidad en su superficie, considerada como el futuro poro de emergencia del trofozoito. (9B) una ligera prominencia se aprecia (parte superior) supuestamente en la misma región de la cavidad. (9C) Un tiempo después, la prominencia es mayor y se aprecia como un inminente rompimiento de la misma. (9D) El rompimiento ha sucedido, posiblemente ayudado por una presión interna del trofozoito en este sitio. - - (9A) 3,600 X, (9B) 4,400 X, (9C) 4,800 X, (9D) 2,000 X.

VIII. CONCLUSIONES

De los resultados anteriores podemos concluir:

- 1.- Se ha desarrollado un nuevo y eficiente método para inducir enquistamiento masivo in vitro en Entamoeba invadens, importante para el estudio del quiste, fase infectiva -- de la amibiasis.
- 2.- La formación de los cuerpos cromatoides puede ser inducida en trofozoitos de Entamoeba invadens aún durante la fase activa de crecimiento (fase-log) si éstos son crecidos con alta tensión de CO₂.

IX. CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS

La implementación del método aquí descrito para inducir-enquistamiento en Entamoeba invadens a través de condiciones que semejan las condiciones in vivo, abre una nueva alternativa a los investigadores de la biología del enquistamiento - en cuanto a la posibilidad de poder manejar el enquistamiento, desenquistamiento e inactivación del quiste a nivel del medio ambiente, permitiendo así, ante todo, la prevención de la amibiasis. Paradójicamente, el quiste, fase infectiva de la amibiasis es un aspecto muy pobremente estudiado comparado a otros aspectos de este parásito y de la amibiasis en general.

Por otra parte, las conclusiones obtenidas de los presentes resultados en el sentido de que los cuerpos cromatoides - son compatibles con el ciclo celular normal de Entamoeba invadens en las condiciones aquí ensayadas, contrario a las conclusiones de Kusamrarn y col. (17), sugiere la presencia en estos organismos de mecanismos de regulación en la síntesis de ribosomas y cuerpos cromatoides durante el enquistamiento. Mecanismos aparentemente hasta ahora no considerados, lo que abre el camino a la búsqueda de tales estrategias en la diferenciación de Entamoeba.

X. LITERATURA CITADA

- 1.- Balamuth, W. Effects of some enviromental factors upon -
growth and encystation of Entamoeba invadens. J . - -
Parasitol. 48: 101 (1961)
- 2.- Band, R. N, y H. Cirrito. Growth response of axenic - -
Entamoeba histolytica to hydrogen, carbon dioxide, and -
oxygen. J. Protozool. 26 (2): 282-286 (1979)
- 3.- Barker, D. C. Ribosome structures revelated by negative
staining subcellular factions from a crystalline - - -
ribonucleoprotein body. Exp. Cell. Res. 32: 272 (1963)
- 4.- Barker, D. C. y K. Deutsch. The chromatoid body of - -
Entamoeba invadens. Exp. Cell. Res. 15: 604-610 (1958)
- 5.- Barker, D. C. y L. S. Swales. Characteristics of - - -
ribosomes during differentiation from trophozoite to --
cyst in axenic Entamoeba sp. Cell Differentiation. 1: --
297-306 (1972)
- 6.- Behnke, O. Helical arrangement of ribosomes in the - - -
cytoplasm of differentiating cells of the small - - -
intestine of rat foetuses. Exp. Cell Res. 30: 597 - -
(1963)

- 7.- Byers, B. Structure and formation of ribosome crystals in hypothermic chick embryo cells. J. Mol. Biol. 26 155-167 (1967)
- 8.- Cervantes-Mamoa, A. y A. Martínez Palomo. Estudio del ciclo vital de Entamoeba invadens mediante cinematografía espaciada. Arch Invent. Méd. (Mex). 11 (Suppl: 1): 31 - (1980)
- 9.- Chang, S. L. Studies on Entamoeba histolytica. IV the relation of oxidation-reduction potentials to the growth encystation and excystation of Entamoeba histolytica in culture. J. Parasitol. 37: 101 (1946)
- 10.- De Robertis, E. D. P. y E. M. F. De Robertis. Cell and molecular Biology. 7a Edición, Saunders College. Cap 26 (1980).
-
- 11.- Deutsch, K. y V. Zaman. An electron microscopio study of Entamoeba invadens Rodhain 1934. Exp. Cell. Res. 17: 310 (1959)
- 12.- Diamond, L. S. Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudin 1903 and Entamoeba histolytica like amebae. J. Parasitol. 54: 1047 (1968)

- 13.- Diamond, L. S., D. R. Harlow y C. C. Cunnick. A new --
medium for the axenic cultivation of Entamoeba - - -
histolytica and other Entamoeba. Trans Roy. Soc. Trop. -
Med Hyg 72: 431 (1978)
- 14.- Feria, V. A. y N. Treviño. The ultrastructure of - -
trophozoites of Entamoeba histolytica with particular --
reference to spherical arrangements of osmiophile - - -
cylindrical bodies. J. Protozool. 19: 200 (1972)
- 15.- Geiman, Q. M. y H. L. Ratcliffe. Morphology and life - -
cycle of an amoeba producing amoebiasis in reptiles. J. :
Parasitol. 20: 208 (1936)
- 16.- Jack, B. L. Introduction to molecular biological - - - -
techniques. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliff, N. J.
(1966)
-
- 17.- Kusamrarn T., P. Sobhon y G. B. Bailey. The mechanism [®]
of formation of inhibitor-induced ribosome helices in --
Entamoeba invadens. J. Cell. Biol. 65: 529 (1975)
- 18.- Kusamrarn, T., K. Vinijsaikul, y G. B. Bailey, - - -
Comparision of the structure and function of polysomal -
and helical ribosomes from Entamoeba invadens. The J.
of Cell. Biology. 65: 540-548 (1975)

- 19.- Lasman, M. The fine structure of Acanthamoeba astronix with special emphasis on encystment. J. Protozool. 29: 458 (1982)
- 20.- López Revilla, R. Manual para el cultivo axénico de Entamoeba histolytica. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, D.F. (1981)
- 21.- Ludvik, J. y A. C. Shipstone, The ultraestructure of Entamoeba histolytica. Bull Org. Mond. Santé. 43: 301 (1970)
- 22.- Martínez, P. A.; R. A. González y B. Chávez de Ramírez. Estructura ultramicroscópica de varias cepas de Entamoeba. Arch. Inv. Méd. 1: 214 (1986)
- 23.- McConnachie, E. W. Studies on Entamoeba invadens Rodhain, 1934 in vitro an its relationship to some other species of Entamoeba. J. Parasitol. 59: 41 (1955) ®
- 24.- Morales-Vallarta, M., M. Carranza-Rosales, J. Ruíz-Ordoñez y J. Verduzco-Martínez. Cell Wall morphogenesis during differentiation of Entamoeba invadens (Protozoa: Sarcodina) Trans. Am. Microsc. Soc. 108: 204 (1989)

- 25.- Morimoto, T. G. Blobel y D. D. Sabatini. Ribosome cristallization in chicken embryos. II Condition for the formation of ribosome tetramers in vivo. *J. Cell Biology*. 52: 355-366 (1972)
- 26.- Olive, L. S. The mycetozoans. Academic Press, New York. San Francisco London. pp 186-187 (1975)
- 27.- Proctor, E. M. Studies of the ultraestructure of various strains of Entamoeba histolytica and of Entamoeba coli. *Arch. Inv. Méd.* 1: 311 (1986)
- 28.- Ramos, G. M. Diferencias estructurales de trofozoitos de Entamoeba invadens cepa 1P-1 en medio TP-S-1 con diferente tensión de CO₂. U.A.N.L. Fac. de Ciencias Biológicas. (1987)
-
- 29.- Rengpien, S. y G. B. Bailey. Differentiation of Entamoeba: A new medium and optimal conditions for axenic encystation of Entamoeba invadens. *J. Parasitol.* 70: 629 (1984)
- 30.- Rodhain, J. Entamoeba invadens parasite de serpents. *C. R. Soc. Biol. Paris.* 117: 1195-1200 (1934)

- 31.- Siddiqui, W. A. y M. A. Rudzinka. The fine structure --
of axenically grown trophozoites of Entamoeba invadens -
with special reference to the nucleus and helical ribonu-
cleoprotein bodies. J. Protozool. 12: 448 (1965)
- 32.- Snyder, T. L. y H. E. Melency. The excystation of - - -
Entamoeba histolytica in bacteriologically sterile media.
Am. J. Trop. Med. 21: 63 (1941)
- 33.- Waddington, C. H. y M. M. Perry. Helical arrangement of
ribosomes in diferentiating muscle cells. Exp. Cell. --
Research. 30: 599-600 (1963)
- 34.- Walsh, A. W. y I. S. Isquith. Scanning electron - - -
microscopy of cyst of the ciliate Blepharisma stoltei. -
Trans. Am. Microsc. Soc. 98: 261 (1979)
-
- 35.- Zaman, V. The ultraestructure of cyst of Entamoeba - -
invadens. Ann. Trop. Méd. Parasit. 67 (2): 229-231 - -
(1973)

