

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETERMINACION DE LA AUXOTROFIA DE
Entamoeba histolytica PARA COLESTEROL
FOSFOLIPIDOS Y ACIDOS GRASOS

T E S I S

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

PRESENTA:

M. EN C. BENITO DAVID MATA CARDENAS

ENERO DE 1998

C.1
M37
A5
RC121
FD

DR. BENITO DAVID

WATA CARDENAS



1080087120

9512

14.00

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE
Entamoeba histolytica PARA COLESTEROL,
FOSFOLÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS

TESIS

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

PRESENTA:

MR. EN C. BENITO DAVID MATA CARDENAS



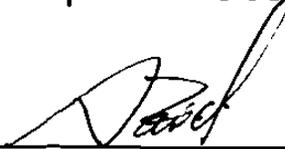
ENERO DE 1998

TD
RC121
ASZ
M3



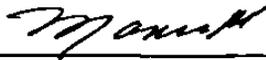
DETERMINACIÓN DE LA AUXOTROFÍA DE *Entamoeba histolytica* PARA COLESTEROL, FOSFOLÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS.

Aprobación por comité de Tesis



Dr. Salvador L. Said y Fernández

Presidente



Dr. Mario R. Morales Vallarta

Secretario



Dra. Julia Verde Star

Vocal



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez

Vocal



Dr. Javier Vargas Villarreal

Vocal

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social y en el laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Salvador L. Saíd y Fernández.

DEDICATORIA

A LA MEMORIA DE MIS PADRES:

DON BENITO MATA URDIALES qepd
Y
Q. B. F. MARIA TERESA CARDENAS DE MATA qepd

A MI ESPOSA SYLVIA MONTOYA DE MATA

A MIS HIJOS:

BENITO DAVID MATA MONTOYA
CARLOS EDUARDO MATA MONTOYA
SYLVIA LETICIA MATA MONTOYA
QUE CON SU APOYO Y CARIÑO SE
LOGRAN TODAS LAS METAS
QUE NOS PROPONEMOS

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Salvador Saíd Fernández por su enseñanza, dirección, asesoría y por la amistad que me ha brindado desde que formamos la división de Biología Celular.

Al Dr. Mario Morales Vallarta mi maestro de toda la vida, por su enseñanza y asesoría para este trabajo y por la amistad de muchos años.

Al Dr. Javier Vargas Villarreal, por sus consejos, asesoría, atinadas observaciones para este trabajo y por su amistad, valioso apoyo para un amigo.

A la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez por sus consejos y por la revisión de esta tesis.

A la Dra. Julia Verde Star por sus atinadas observaciones y revisión de esta tesis.

A la Dra. María Teresa González Garza y Barrón por sus observaciones, consejos y amistad.

A la Q.F.B. Leticia Navarro Marmolejo por su amistad y apoyo técnico para la realización de esta tesis.

Al Sr. Manuel Gutiérrez Rueda por su amistad y apoyo técnico para la preparación de material para la realización de esta tesis.

Al C.P. Héctor Ignacio Atristain y Alarcón Administrador del Centro de Investigación Biomédica del Noreste por su amistad y apoyo para conseguir material de laboratorio para la elaboración de esta tesis.

Al Sr. Luis Rodríguez Rodríguez Jefe de Personal del Centro de Investigación Biomédica del Noreste por su apoyo y amistad.

Al Dr. Antonio Luna de la Rosa y al Sr. Francisco Treviño González por su amistad y el trabajo gráfico y fotográfico de esta tesis.

Al M.V.Z. Hector Gerardo Lozano Garza por su amistad y apoyo técnico para el manejo de animales y por su habilidad quirúrgica para la inoculación intrahepática de los hámsters.

A la Sra. María del Refugio Garza y al Sr. Abel Navarro por todas las facilidades otorgadas en la recuperación de referencias bibliográficas.

A mi querida esposa Sylvia Montoya de Mata por su cariño y apoyo incondicional, que a través de los años se ha convertido en un ser necesario en mi vida.

A mis hijos, Benito David, Carlos Eduardo y Sylvia Leticia quienes han sido mi motivo de superación, esta tesis es vuestra.

Al Sr. Pablo Montoya Rodríguez y Sra. Eloísa Villanueva de Montoya, mis suegros quienes han sido una conducta a seguir.

A los integrantes de la División de Biología Celular y Molecular.

Al personal y estudiantes del Centro de Investigación Biomédica del Noreste.

INDICE

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XI
INTRODUCCION	1
Definición e importancia epidemiológica	1
Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	2
Interacción huésped-parásito	3
Cultivo de <i>Entamoeba histolytica</i>	3
Hipótesis	9
Objetivos general	9
Objetivos específicos	9
MATERIALES	10
Origen de los reactivos	10
Material biológico	10
Amibas	10
Animales de laboratorio	11
PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	11
Medio basal PEHP	11
Medio basal TYI-33	12
PEHP más el sustituto de suero basal	12
TYI más el sustituto de suero basal	12
Medio basal PEHP-PACSR	12
Preparación del suero bovino	14
COMPOSICION Y PREPARACION DE SOLUCIONES	14
Solución salina balanceada (SSB) 10 X	15
Solución de Alsever 10X	15
Solución salina amortiguada de fosfatos (PBS)	15
Seroalbúmina bovina fracción V al 25 % (SAB)	16
Seroalbúmina bovina deslipidizada al 25 % (SAB-DL)	16
Solución de Earle	16
Solución 1 de sales	16
Soluciones de aminoácidos	17
Solución de trabajo de Earle	18
PACSR	18
Solución de vitaminas	18

Mezcla vitamínica 107	19
Mezcla vitamínica-Tween 80	21
Soluciones de lípidos presentes en el LCR	21
Mezcla de lípidos	22
METODOS	25
Cultivos amibianos axénicos	25
Métodos de cultivo	26
Efecto de concentraciones variables de nutrientes añadidos al PEHP o PEHP-SBS	26
Análisis del efecto de los componentes del LCR en forma individual en el crecimiento de <i>E. histolytica</i>	26
Cultivos masivos	28
Obtención de la fracción vesicular (P30)	28
Cuantificación de proteínas por Lowry	29
OBTENCION DE ERITROCITOS DE RATA	30
Colección de sangre	30
Lavado y almacenamiento de eritrocitos	30
Cuantificación de la actividad hemolítica de los extractos amibianos	31
Inducción de absceso hepático en hámsters	31
Métodos estadísticos	32
RESULTADOS	34
Efecto de SAB más vitaminas, LCR y LCR + vitaminas sobre la sobrevivencia de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	34
Curva dosis respuesta de SAB en presencia de SBS	35
Curva dosis respuesta de SAB deslipidizada (SAB-DL) en presencia de SBS	36
Efecto promotor del crecimiento de la glucosa	36
Efecto de diferentes volúmenes de la solución de Earle en lugar de SAB-DL	40
Crecimiento de tres cepas de <i>E. histolytica</i> en PEHP-PACSR	40
Crecimiento de la cepa HM1:IMSS en TYI-PACSR	43
Efecto de los lípidos individuales sobre el crecimiento de <i>E. histolytica</i>	43
Efecto de mezclas de lípidos sobre el crecimiento de <i>E. histolytica</i>	43
Efecto de las lipoproteínas sobre el crecimiento de <i>E. histolytica</i> cepa HK9:NIH	44
Optimación de la concentración de lipoproteínas para las distintas cepas de <i>E. histolytica</i>	46
Caracterización de la actividad hemolítica de la P30 de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> cepa HM1:IMSS crecidas en PEHPS, PEHP-PACSR y PEHP-LIPO	52
Capacidad de la cepa HM1:IMSS crecida en PEHPS, PEHP-PACSR y PEHP-LIPO para producir abscesos hepáticos en hámsters	57
DISCUSION	61
CONCLUSIONES	71
PERSPECTIVAS	73
REFERENCIAS	74

LISTA DE FIGURAS

1. Obtención de las fracciones subcelulares amibianas.	29
2. Efecto de la mezcla de lípidos (LCR), con y sin vitaminas, y/o seroalbúmina bovina al 10 % en el crecimiento de la cepa HK9:NIH en ausencia de suero.	35
3. Efecto de diferentes concentraciones de seroalbúmina Bovina fracción V, añadida al SBS (50 μ l de LCR más de 10 μ l de mezcla vitamínica) sobre el crecimiento de la cepa HK9:NIH.	37
4. Efecto de diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina fracción V, deslipídizada (SAB-DL) añadida al SBS (50 μ l de LCR más de 10 μ l de mezcla vitamínica) sobre el crecimiento de la cepa HK9:NIH.	38
5. Efecto de los distintos componentes del PACSR añadidos al PEHP sobre el crecimiento de la cepa HK9:NIH.	45
6. Relación temporal de hemólisis producida por la fracción P30 de trofozoítos cultivados en PEHPS.	53
7. Curva dosis-respuesta de la fracción P30 de la cepa HM1:IMSS crecida en PEHPS.	54
8. Curva dosis-respuesta de la fracción P30 de la cepa HM1:IMSS crecida en PEHP-PACSR.	55
9. Curva dosis-respuesta de la fracción P30 de la cepa HM1:IMSS crecida en PEHP-LIPO.	56
10. Abscesos hepáticos en hámsters inoculados con trofozoítos cultivados en PEHPS.	58
11. Abscesos hepáticos en hámsters inoculados con trofozoítos cultivados en PEHP-PACSR.	59
12. Abscesos hepáticos en hámsters inoculados con trofozoítos cultivados PEHP-LIPO.	60

LISTA DE TABLAS

1. Composición de dos medios de cultivos para <i>E. histolytica</i> en condiciones axénicas.	13
2. Composición del sustituto de suero (PACSR).	23
3. Análisis del efecto de los componentes lipídicos del LCR Sobre el crecimiento de <i>E. histolytica</i> en un medio libre de suero.	24
4. Parámetros típicos de crecimiento de tres cepas axénicas De <i>E. histolytica</i> en dos medios de cultivo.	25
5. Concentración de los componentes presentes en el LCR.	27
6. Efecto de diferentes concentraciones de glucosa adicionada al PEHP y su relación sobre el crecimiento de la cepa HK9:NIH.	39
7. Efecto de volúmenes variables de la solución de aminoácidos de Eagle sobre el crecimiento de la cepa HK9:NIH.	41
8. Rendimientos de <i>E. histolytica</i> crecidos en PEHP-PACSR o TYI-PACSR después de un programa de subcultivo a plazo corto.	42
9. Rendimientos de <i>E. histolytica</i> crecidos en PEHP-PACSR o TYI-PACSR después de un programa de subcultivo a plazo largo.	42
10. Rendimientos de la cepa HK9:NIH cultivada en medio PEHP con concentraciones variables de lipoproteínas.	48
11. Rendimientos de la cepa HM1:IMSS cultivada en medio PEHP con concentraciones variables de lipoproteínas.	49
12. Rendimientos de la cepa HM3:IMSS cultivada en medio PEHP con concentraciones variables de lipoproteínas.	50
13. Rendimientos de la cepa HM1:IMSS cultivada en medio TYI con concentraciones variables de lipoproteínas.	51
14. Relación de animales que presentaron absceso hepático amibiano	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ml	Mililitro
μl	Microlitro
g	Gramos
N	Concentración normal
X	Concentración con respecto a la solución de trabajo
Min	Minutos
h	Horas
SSB	Solución salina de Hanks
PBS	Solución salina amortiguada
SAB	Seroalbúmina bovina
SAB-DL	Seroalbúmina bovina deslipidizada
pH	Potencial de hidrógeno
P	Probabilidad
°C	Grados centígrados
SBS	Solución basal sustituto de suero

RESUMEN

Propósito y Método de estudio: El propósito del presente trabajo fue investigar si el colesterol, fosfolípidos y algunos ácidos grasos son esenciales para el crecimiento de *Entamoeba histolytica* cultivada en condiciones axénicas. Actualmente se conoce muy poco acerca del metabolismo de lípidos de *E. histolytica*. Esto es debido principalmente a que el suero de bovino o equino, un componente esencial de los medios de cultivo, es la principal fuente de lípidos para estos protozoarios y tiene una composición indefinida. Por lo tanto un requisito para identificar a los lípidos que son esenciales para el crecimiento de *E. histolytica*, es el desarrollo de un sustituto de suero, de composición conocida, lo cual constituyó el propósito del presente trabajo. Este consistió de tres etapas. En la primera nos propusimos desarrollar un sustituto de suero y analizar sus efectos sobre el crecimiento de tres cepas axénicas de *E. histolytica*; en la segunda etapa abordamos el problema que nos planteamos en el presente trabajo: investigar si el colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos son esenciales para las amibas cultivadas en condiciones axénicas y en la tercera y última etapa; investigamos si las amibas cultivadas en PEHP más el sustituto de suero o de los lípidos esenciales conservaban su actividad hemolítica y su capacidad para producir abscesos en hámsters inoculados experimentalmente. Los objetivos fueron los siguientes: a) analizar el crecimiento de *E. histolytica* en condiciones axénicas usando una mezcla comercial de lípidos (LCR), en lugar de suero, el cual está constituido por colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos y lipoproteínas, b) optimar el crecimiento amibiano, cultivando las amibas en medio basal PEHP más LCR adicionado más con SAB, SAB deslipidizada, glucosa y aminoácidos, c) probar la eficacia del sustituto del suero, en las cepas HK9:NIH, HM1:IMSS y HM3:IMSS en el medio PEHP y la cepa HM1:IMSS cultivada en TYI y sus rendimientos comparados contra el testigo PEHPS, d) analizar el crecimiento amibiano en presencia de cada

uno de los componentes lipídicos del LCR o cada una de las combinaciones posibles (en ausencia de lipoproteínas), e) analizar el efecto de las lipoproteínas solas sobre el crecimiento de las amibas en condiciones axénicas, f) analizar el efecto del PACSR y lipoproteínas solas sobre el crecimiento de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS en medio TYI, g) analizar la potencia hemolítica *in vitro* de los cultivos de la cepa HM1:IMSS y la capacidad de estas amibas para producir abscesos hepáticos amibianos que fueron cultivados en PEHP más suero bovino, PEHP más sustituto de suero (PACSR) o PEHP más lipoproteínas.

Contribuciones: Primera parte: Desarrollo de un sustituto de suero para el cultivo axénico de *E. histolytica*: 1) la cepa HK9:NIH no creció en el medio PEHP adicionado con LCR en vez de suero, pero las amibas se mantuvieron viables hasta por 72 h, lo cual indicó que los lípidos por sí solos fueron capaces de sostener la vida de las amibas aunque no su crecimiento. 2) Los rendimientos de las amibas cultivadas en LCR (10 ml/l) más 10g/l de SAB, se incrementan 8 veces con respecto a los cultivos suplementados únicamente con LCR y hasta 12 veces si al LCR + SAB se le agregaba la mezcla vitamínica tween 80 de Diamond. Por esta razón, decidimos utilizar a las vitaminas en los siguientes experimentos del presente trabajo. El incremento en el crecimiento de los cultivos de *E. histolytica* al agregar SAB al medio de cultivo en ausencia de suero y en presencia de LCR puede deberse al efecto de los lípidos u otras moléculas que porta la SAB. 3) Cuando se analizó el efecto de SAB deslipidizada sobre el crecimiento de los cultivos se observaron rendimientos similares a los observados con SAB. Sin embargo, el efecto se observó con una concentración de 1.25 g/l, es decir 50 % menor que la requerida con SAB (2.50 g/l). Lo que indica que el crecimiento de las amibas se debió a la proteína en sí y no a las moléculas que porta el SAB. Pero además, la disminución en la concentración de SAB deslipidizada con

respecto a la no deslipidizada sugieren que ésta última portaba algún inhibidor del crecimiento amibiano. Sin embargo, bajo estas condiciones, los rendimientos fueron bajos comparados con los testigos. Posiblemente esto se debió a que le faltaban carbohidratos como fuente de energía y/o carbono. 4) Cuando se incrementó la cantidad de glucosa de 6.0 g/l a 9.2 g/l en el medio, se incrementaron los rendimientos en un 45 % con respecto a los cultivos testigos que contenían 6.0 g/l. 5) Cuando la SAB deslipidizada se substituyó por los 20 aminoácidos más utilizados por la mayoría de las células (mezcla de aminoácidos de Earle) las amibas alcanzaron rendimientos equivalentes al 50 % con respecto a los testigos mantenidos en PEHPS. Entonces las amibas requieren los aminoácidos y no a la SAB en sí misma. 6) El PACSR permitió el crecimiento de las cepas HK9:NIH, HM1:IMSS y HM3:IMSS cultivadas en PEHP-PACSR o TYI-PACSR. Los rendimientos de los cultivos mantenidos en estos medios, con respecto a los cultivos en PEHPS o TYI-S-33 fueron los siguientes: en PEHP-PACSR la cepa HK9:NIH dio 122 %, la HM1:IMSS el 38 % y HM1:IMSS el 44 % y en TYI-PACSR solo se trabajó con la cepa HM1:IMSS dando un 75 %, en el programa a plazo corto. De acuerdo con los resultados anteriores, concluimos que contábamos ya con un sustituto de suero confiable, denominado sustituto de suero para el cultivo axénico de protozoarios, PACSR, por sus siglas en inglés (Protozoa Axenic Cultivation Serum Replacement; patente en trámite) y podríamos abordar el problema crucial del presente trabajo: ¿*Entamoeba histolytica* es auxótrofa de colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos?.

Segunda parte: Análisis de la auxotrofia de *E. histolytica* por los lípidos del suero.

7) Para esto se hicieron diferentes mezclas de los lípidos que contiene el LCR, excepto las lipoproteínas (porque éstas contienen todos los lípidos cuyo efecto se iba a analizar). Además se eliminó sistemáticamente sólo uno de los lípidos que componen el LCR. De esta forma pudo

analizarse el efecto de la ausencia de cada uno de los lípidos mencionados sobre el crecimiento de los cultivos amibianos. Observamos que en ninguna de las mezclas antes referidas crecieron las amibas. Lo cual sugería que el único componente del LCR que es capaz de promover el crecimiento de *E. histolytica* en condiciones axénicas eran las lipoproteínas. 8) Cuando analizamos el efecto de lipoproteínas solas sobre los rendimientos de los cultivos, encontramos que los trofozoítos sí crecieron, aunque en una proporción 60 % menor que los testigos, con una concentración equivalente a la que tiene PEHP-PACSR. De lo anterior concluimos que las amibas sí son auxótrofas de lípidos, pero éstas no pueden utilizarlos a menos que los lípidos estén estructurados en forma de lipoproteínas. Con estos experimentos concluimos la segunda etapa del proyecto.

Tercera parte: Análisis de actividades biológicas. Realizamos esta última serie de experimentos para saber si las amibas crecidas en ausencia de suero conservaban algunas de sus actividades biológicas, como la actividad hemolítica *in vitro* o la capacidad para producir abscesos. 9) cuando se hicieron los experimentos correspondientes a la actividad hemolítica encontramos que las amibas crecidas tanto, en PACSR como con lipoproteínas, en vez de suero, conservan su actividad hemolítica, aunque en una proporción 40 % menor con PACSR y del 60 % menor con lipoproteínas, que los testigos mantenidos en PEHPS. Con respecto a la capacidad para producir abscesos encontramos que las amibas mantenidas en PEHPS y/o PACSR produjeron abscesos muy grandes (ocupando la mayor parte del lóbulo derecho del hígado). Por otro lado, las amibas mantenidas en lipoproteínas fueron capaces de producir abscesos, pero de un tamaño considerablemente menor a los que produjeron las amibas mantenidos en presencia de

suero o PACSR; lo que indicó que las amibas requieren otros de los elementos que contiene el PACSR (vitaminas y/o aminoácidos).

En conclusión: Las amibas son capaces de crecer en ausencia de suero, si el medio PEHP o TYI se suplementan con lípidos, vitaminas y aminoácidos. *E. histolytica* es auxótrofa de colesterol, fosfolípidos, ésteres de colesterol ó ácidos grasos libres, pero estos deben estar estructurados en forma de lipoproteínas para ser internalizadas y aprovechadas por las amibas. En este trabajo no fue posible precisar cual o cuales de los lípidos contenidos en las lipoproteínas son esenciales para *E. histolytica* por la naturaleza misma de las lipoproteínas. Nuestras observaciones sugieren fuertemente también que algún, algunos o todos los aminoácidos de la mezcla de Earle son esenciales para las amibas. Pensamos que el presente trabajo permitió conocer un aspecto muy importante sobre el metabolismo de *E. histolytica* en condiciones axénicas. Por otro lado, desarrollamos un sustituto de suero para el cultivo axénico de *E. histolytica* llamado PACSR y lipoproteínas que adicionados al PEHP o al TYI permiten el crecimiento de las cepas axénicas de *E. histolytica*. Pensamos que los resultados obtenidos en esta tesis permitirán diseñar en un futuro inmediato, experimentos sin la interferencia del suero en cultivo. Con las lipoproteínas como único abastecedor de lípidos en el medio y con ello, podemos ahora enfocarnos al diseño de un medio definido para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*.

INTRODUCCION

Definición e importancia epidemiológica.

La amibiasis es una infección parasitaria ocasionada por *Entamoeba histolytica* con o sin síntomas clínicos (Kretschmer, 1994). Se distribuye universalmente afectando aproximadamente al 10 % de la población mundial (Walsh, 1986). En México constituye un problema muy importante de salud pública por su frecuencia y mortalidad (Gutiérrez y Muñoz, 1994).

Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.

El ciclo de vida de *E. histolytica* consiste en una forma infecciosa, el quiste y una trófica, el trofozoíto. El quiste se caracteriza por ser más pequeño que el trofozoíto, inmóvil y redondo, y por la presencia de pared celular, la cual contiene quitina, (Arroyo-Begovich y col, 1980). La pared protege al parásito de las condiciones adversas del medio ambiente. Bajo algunas de estas condiciones adversas, como la hipoosmolaridad, el quiste puede sobrevivir por largos períodos de tiempo. Cuando el quiste se encuentra en condiciones adecuadas, (p. ej. en presencia de enzimas digestivas y baja tensión de oxígeno, como el que se encuentra en el intestino grueso), emergen las amibas metaquísticas, que se reproducen rápidamente. El trofozoíto es móvil y no juega ningún papel en la transmisión de la enfermedad, pero es responsable de producir las lesiones tisulares en el hospedero (Martínez-Palomo, 1993).

∴

Interacción huésped-parásito.

Las bases celulares de la actividad lítica de *E. histolytica* han sido exploradas al estudiar el efecto de la cepa virulenta HM1:IMSS y de cepas menos patógenas como HK9:NIH en monocapas de células cultivadas *in vitro* (Vargas-Villarreal y Saíd-Fernández, 1984). Se ha reportado que la actividad lítica que *E. histolytica* presenta en los mecanismos de agresión de los trofozoítos a las células blanco son complejos y multifactoriales (Saíd-Fernández y Vargas-Villarreal, 1986; Ravdin y Guerrant, 1982).

En los últimos años se han propuesto las siguientes etapas como constituyentes probables de una parte importante de los mecanismos patogénicos de la amibiasis, estas son: adhesión a las células blanco, citólisis por contacto, fagocitosis y degradación intracelular (Kretschmer, 1994).

Para que *E. histolytica* pueda causar daño a las células del huésped es necesario que se adhiera a la superficie celular mediante reconocimiento de moléculas en la superficie del parásito y en las de las células blanco. Se ha determinado que en la adhesión están involucradas lectinas que contienen N-acetilglucosamina (Kobiler y col, 1981). Además de estas lectinas también se ha propuesto que están involucrados algunos receptores de superficie. Algunos de estos receptores amibianos actúan, por ejemplo, en el reconocimiento específico de colágena y la unión de los receptores específicos de las amibas con la colágena activa la secreción de la colagenasa de los trofozoítos al medio externo (Martínez-Palomo, 1993).

Después de la adhesión a las células blanco, las amibas lisan a las células blanco mediante la acción de varias citolisinas que hidrolizan componentes de la membrana

plasmática de las células blanco o la desestabilizan. Entre las citolisinas, se han propuesto a las siguientes: colagenasa (Muñoz y col, 1982), proteasas dependientes de grupos SH (Pérez-Montfort y col, 1987), algunas toxinas (Lushbaugh y col., 1981), la fosfolipasa A (Saíd-Fernández S y López-Revilla R, 1988; Long-Kurg y col., 1985; Vargas-Villarreal y col, 1995), por acción de las proteínas formadoras de poros o amebaporo (Lynch y col, 1982; Ding y Zanvil, 1985).

El siguiente paso es la fagocitosis de las células blanco. Las amibas pueden fagocitar células enteras, demostrando que la lisis de las células blanco no es un paso necesario para la endocitosis (McCaul, 1977). Orozco aisló una mutante deficiente en fagocitosis. Esta mutante además de ser pobre en fagocitosis, también era baja en virulencia cuando se probó en el modelo de hígado de hámster. Estos resultados han propuesto que parece haber una correlación entre fagocitosis y virulencia (Orozco y col, 1983).

Cultivo de *Entamoeba histolytica*.

E. histolytica se cultivó por primera vez en 1925, 50 años después de su descubrimiento en 1875. El cultivo se efectuó utilizando medios bifásicos, que contenían una base de yema de huevo y solución salina o albúmina de huevo fresco en presencia de flora entérica humana de composición desconocida (cultivo xénico) (Boeck y Drbohlav, 1925).

El primer cultivo monoxénico de *E. histolytica* fue obtenido en 1930 por Cleveland y Sanders. Estos autores utilizaron un medio difásico, el cual contenía 6 diferentes especies de bacterias además de una infusión de hígado-agar peptona (Cleveland and Sanders 1930).

Estos cultivos fueron mejorados en 1941 cuando asociaron a las amibas con un bacilo gramnegativo microaerofílico denominado organismo "t" (Rees y col, 1941). Más tarde Jacobs introdujo en 1947 el uso de un antibiótico, la penicilina, para inhibir y eventualmente eliminar una bacteria sensible, *Clostridium perfringens*, de un cultivo monoxénico amiba-bacteria (Jacobs, 1947). Phillips fue el primero en cultivar a *E. histolytica* en 1950 en presencia de otro protozooario, en este caso *Trypanosoma cruzi* (Phillips, 1950).

Diamond utilizó cultivos monoxénicos en los que asoció a las amibas con un tripanosomátido (*Crithidia sp.*) como punto de partida para obtener los primeros cultivos axénicos de *E. histolytica* (Diamond, 1961). El primer medio que desarrolló era bifásico, con una base sólida de agar y cubierta con solución de nutrientes, suplementado con vitaminas y un extracto de embrión de pollo (CEEM25). Este medio de cultivo no era práctico, y no fue hasta en 1968 en que se describió el TP-S-1. Este era un medio líquido, claro, libre de extracto de embrión de pollo y agar. Su efectividad se debió a la introducción de un digerido de hígado de buey (Panmede) como uno de los ingredientes principales del TP-S-1 (Diamond, 1968). Este medio permitió por primera vez el cultivo masivo de *E. histolytica*, para la obtención de antígenos para fines diagnósticos, para pruebas serológicas, bioquímicas y estudios para el desarrollo de medicamentos antiamebianos.

Desafortunadamente hubo muchos problemas para adquirir el Panmede y el medio producía rendimientos muy variables (Diamond, 1978). Estos problemas condujeron en 1978 a la creación del TYI-S-33. Un medio más efectivo que el TP-S-1, debido a que el TYI-S-33 producía rendimientos más altos y menos variables. En este medio el Panmede se

sustituyó por extracto de levadura, suplementado con hierro, vitamina B₁₂, ácido tióctico y tween 80 (Diamond 1978),.

La calidad de los cultivos de *E. histolytica* cuando se cultivaba en TYI-S-33 dependía de los lotes de extracto de levadura. En nuestro laboratorio se diseñó un nuevo medio de cultivo, como una alternativa a los ya existentes. Este medio se le denominó PEHPS, por sus siglas en español, (Peptona, Extracto de Hígado y Páncreas, y suero) (Saíd-Fernández y col, 1988). Con las siguientes ventajas: a) reproducibilidad en sus rendimientos; b) altos rendimientos; c) pueden desarrollarse cultivos a partir de inóculos tan bajos como un trofozoíto/ml; d) se puede almacenar durante 9 meses a temperatura ambiente; e) en este medio se inicia el proceso de enquistamiento (Mata-Cárdenas y Saíd-Fernández, 1986).

Todos los medios de cultivo antes mencionados contienen dos o más productos biológicos complejos indefinidos, por ejemplo; extractos de hígados y huevo incluyendo el suero. Esto ha causado que el estudio de los requerimientos nutricionales de *E. histolytica* sea limitado.

Las dificultades encontradas para el crecimiento axénico y diferenciación de *E. histolytica* han obligado a varios grupos a trabajar con cultivos de *E. invadens*, un parásito que puede causar disentería y absceso hepático en reptiles. Esta especie es menos susceptible a cambios en el medio y produce mejores rendimientos que *E. histolytica* (McConnachie, 1955).

Van Vliet y col. en 1975 demostraron que entre los componentes séricos, los lípidos son esenciales para el crecimiento de *E. invadens* y además que el suero puede ser

sustituido por una mezcla de ácidos grasos insaturados, albúmina, tween 80 y colesterol. Esta mezcla no cumplió los requerimientos séricos para *E. histolytica*.

Con este sustituto de suero se describió la composición de fosfolípidos de *E. invadens*. Encontrándose a la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol como los principales fosfolípidos presentes en *E. invadens*. (Van Vliet y col, 1975b).

El suero es un requerimiento esencial para el crecimiento axénico de *Entamoeba*, se ha utilizado de diferentes especies de animales (caballo, bovino, búfalo entre otros). El suero es un componente constituido por proteínas, hormonas, factores de crecimiento, lípidos, carbohidratos, vitaminas y cofactores que estimulan el crecimiento de las diferentes especies de *Entamoeba* en cultivo (Diamond, 1983). Sin embargo el uso de suero también representa algunas desventajas. Tales son: a) composición indefinida, b) puede estar contaminado por virus, c) la calidad de los lotes es variable, d) inhibe algunas actividades biológicas, incluyendo citolisinas y proteasas (Freshney, 1987) y e) entorpece severamente la detección y aislamiento de proteínas recombinantes. Estrategia que está en pleno desarrollo actualmente para analizar la importancia de diversas actividades biológicas en la virulencia de *E. histolytica* (Alagón y col., 1996). Por otro lado se ha demostrado que el suero inhibe la actividad colagenolítica de *E. histolytica* (Muñoz y col, 1982) y algunos factores de virulencia (Bos, 1979). Además se sabe que: la albúmina sérica impide la unión de las adhesinas amebianas a las células blanco (Kobiler y col, 1981) y algunas proteasas son inhibidas por las macroglobulinas sérica alfa-1 y alfa-2 (Lushbaugh y col, 1981).

Wittner en 1968 describió un medio para el crecimiento de las amibas donde todos los componentes eran definidos con excepción del suero de caballo.

Utilizando el medio de cultivo PEHP (Saíd-Fernández y col, 1988), como base ideamos un medio de cultivo simplificado donde encontramos que los componentes necesarios eran; el extracto de hígado y páncreas, glucosa, ácido ascórbico y suero bovino (Mata-Cárdenas y Saíd-Fernández, 1990).

Por otro lado se han hecho varios intentos por definir la importancia de los lípidos en el crecimiento de *E. histolytica*. Algunos autores demostraron el requerimiento absoluto por colesterol en cultivos monoxénicos de algunas especies de *Entamoeba*. (Griffin y McCarten, 1949; Latour y col, 1965). Además el colesterol ha sido relacionado con la virulencia de esta especie (Bos y Van de Griend, 1977; Meerovicht y Ghadirian, 1978; Rai y col, 1985; Katiyar y col, 1987; Katiyar y col, 1988).

Gillin y Diamond en 1980 describieron un medio de mantenimiento para *E. histolytica* con todos sus componentes definidos, sin embargo este medio no fue capaz de sustentar el crecimiento amibiano por más de 24 horas.

Más tarde Diamond y Cunnick (1991) desarrollaron un medio de cultivo parcialmente definido que está constituido por aminoácidos, carbohidratos, vitaminas B, precursores de ácidos nucleicos, un factor de crecimiento aislado de la tripticasa, seroalbúmina bovina y una solución de lipoproteína-colesterol. Los dos últimos componentes no están definidos y son de naturaleza lipídica compleja.

Recientemente nuestro grupo informó que en PEHPS adicionado con 0.24 g/l de bilis bovina, el rendimiento de los cultivos de *E. histolytica* se incrementa 1.74 veces con

respecto a los testigos no adicionados. Esta mejoría se debe a que la bilis aportó al medio, nutrientes en los que el PEHPS está deficiente y que las amibas no son capaces de sintetizar. Como la bilis es especialmente rica en colesterol, sales biliares y fosfatidilcolina, es posible que los nutrientes aportados por la bilis sean lípidos, y que éstos sean los responsables del incremento en los rendimientos que observamos (Mata-Cárdenas y col, 1995).

Los cultivos axénicos han sido utilizados para determinar algunos requerimientos nutricionales ((Weik y Reeves, 1980; Reeves y West, 1980; Gillin y Diamond, 1981), así como condiciones fisicoquímicas (pH, potencial de oxido-reducción, y osmolaridad) del medio de cultivo que resulten favorables para el crecimiento amibiano (Gillin y Diamond, 1981b; Dutta y Yadava, 1976).

Hasta ahora no se han definido los requerimientos de lípidos de *E. histolytica*. Para este fin y como estrategia del presente trabajo fue necesario desarrollar un sustituto de suero que permitiera hacer estudios de esta índole ya que se ha demostrado que el suero satisface los requerimientos de lípidos de *E. histolytica* (Mata-Cárdenas y col., 1996; patente en trámite).

HIPOTESIS

Entamoeba histolytica es auxótrofa para colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos.

OBJETIVO GENERAL

Investigar si *Entamoeba histolytica* es auxótrofa para colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Investigar si un compuesto rico en colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos libres, saturados e insaturados y lipoproteínas (LCR), adicionado al medio PEHP o TYI es capaz de sostener la vida de las amibas.
2. Investigar cuales de los componentes lipídicos del LCR son esenciales para el crecimiento de *Entamoeba histolytica*.
3. Definir las concentraciones de los lípidos esenciales para obtener los máximos rendimientos en el medio PEHP (sin suero).
4. Analizar la actividad hemolítica e inducción de absceso hepático amibiano como algunas de las actividades biológicas de *E. histolytica* mejor caracterizadas. Este último con el objeto de saber si estos indicadores de virulencia se modifican en ausencia de suero.

MATERIALES

Origen de los reactivos.

El extracto de levadura y peptona de caseína fueron obtenidos de Bioxon de México. Glucosa, L-cisteína, L-alanina, L-ácido aspártico, L-asparagina.H₂O, L-ácido glutámico, L-prolina, L-serina, L-glutamina, Glicina, L-tirosina, L-cistina, L-arginina, L-valina, L-histidina.HCl, L-lisina, L-leucina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-treonina, L-triptófano, seroalbúmina bovina (fracción V), seroalbúmina bovina deslipidizada, colesterol, fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, esfingomielina, ácido linoleico, ácido oleico, ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido docohexaenoico, reactivo de Folin-Ciocalteu, mezcla de lípidos (LCR), y lipoproteínas fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. (St Louis MO, USA). Cloruro de Sodio, ácido clorhídrico, fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, citrato férrico amónico, sulfato de magnesio, hidroxido de sodio, ácido ascórbico, carbonato de sodio tartrato de sodio y potasio, sulfato cúprico, de Reactivos Monterrey. La solución de vitaminas de Diamond fue obtenida de JRH Biosciences (Lenexa, KS).

Material Biológico.

Amibas.

Para las pruebas *in vitro* utilizamos cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica* cepas HK9:NIH, HM1:IMSS y HM3:IMSS, cultivadas en el medio PEHPS (Saíd-

Fernández y col, 1988) y la cepa HM1:IMSS cultivada en medio TYI-S-33 (Diamond y col, 1978).

Para las pruebas *in vivo* utilizamos trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS capaz de producir abscesos hepáticos. En este caso, HM1:IMSS fue cultivada en medio PEHPS, en PEHP-PACSR y en PEHP adicionado únicamente con lipoproteínas.

Animales de laboratorio.

Como modelo experimental para producir amibiasis hepática, utilizamos hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*), machos recién destetados, con un peso de 40-60 g, los cuales fueron criados y mantenidos en el bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste.

Para el estudio de la actividad hemolítica utilizamos eritrocitos de rata Sprague Dawley

Preparación de los medios de cultivo.

Medio basal PEHP (Saíd-Fernández y col, 1988).

La composición del medio se encuentra en la Tabla 1. Se mezclan los componentes, se disuelven en 250 ml de EHP y se agregan a 600 ml de agua desionizada. El pH se ajusta a 7.0 con NaOH 10 N y se afora a 1,000 ml con agua desionizada. El medio se distribuye en alícuotas de 5 ml en tubos para cultivo de 13 X 100 mm, con tapón de rosca (Kimble,

Vineland NJ, USA). El medio se esteriliza en autoclave por 15 min a 15 lb de presión a 121 °C y se almacena a temperatura ambiente.

Medio basal TYI-33 (Diamond y col, 1978).

La composición del medio TYI se encuentra en la Tabla 1. Se mezclan los componentes, se disuelven en 600 ml de agua desionizada. El pH se ajusta a 7.0 con NaOH 10 N y se afora a 850 ml con agua desionizada. El medio se distribuye en alícuotas de 5 ml en tubos para cultivo de 13 X 100 mm, con tapón de rosca (Kimble, Vineland NJ, USA).

El medio se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 lb de presión a 121 °C y se almacenó a 4 °C.

PEHP más el sustituto del suero basal (PEHP-SBS).

Se añaden 50 μ l de la mezcla de lípidos (LCR) más 10 μ l de la mezcla vitamínica-Tween 80 de Diamond a tubos conteniendo 5 ml del medio basal PEHP.

TYI más el sustituto del suero basal (TYI-SBS).

Se añaden 50 μ l de la mezcla de lípidos (LCR) más 10 μ l de la mezcla vitamínica-Tween 80 de Diamond a tubos conteniendo 5 ml del medio basal TYI.

Medio basal PEHP-PACSR (Mata-Cárdenas y col, 1996).

La composición del medio PEHP se encuentra en la Tabla 1. Se mezcla los componentes y se disuelven en 250 ml de EHP. Después se agregan 600 ml de agua

Tabla 1. Composición de dos medios de cultivos para *E. histolytica* en condiciones axénicas.

Componente	TYI-S-33 ¹	PEHPS ²	PEHP-PACSR ³
Extracto de levadura	10.00 g	0.00 g	0.00 g
Peptona de caseína	20.00 g	20.00 g	20.00 g
Extracto de hígado y páncreas	0.00 g	250.00 ml	250.00 ml
D-glucosa	5.00 g	6.00 g	9.20 g
NaCl	1.00 g	0.00 g	0.00 g
Acido ascórbico	0.20 g	0.20 g	0.20 g
Cisteína.HCl	1.00 g	1.00 g	1.00 g
K ₂ HPO ₄	1.00 g	1.00 g	1.00 g
KH ₂ PO ₄	0.60 g	0.60 g	0.60 g

¹Se resuspende en 500 ml y se afora a 850 ml de agua bidestilada.

²Se resuspende en 500 ml y se afora a 1000 ml de agua bidestilada.

³Se resuspende en 500 ml y se afora a 910 ml de agua bidestilada.

Cada uno de los medios se distribuye en alícuotas de 5 ml en tubos de borosilicato de 13 X 100 mm con tapón de rosca. Estos tubos se esterilizan a 121 °C por 15 min en autoclave. Después se agrega a cada tubo 8 % de suero bovino o de PACSR (v/v).

desionizada. El pH se ajusta a 7.0 con NaOH 10 N y se afora a 920 ml con agua desionizada. El medio se distribuye en alícuotas de 5 ml en tubos para cultivo de 13 X 100 mm, con tapón de rosca (Kimble, Vineland NJ, USA) y se esteriliza en autoclave por 15 min a 15 lb de presión a 121 °C. Se almacena a temperatura ambiente.

Preparación del suero bovino (Saíd-Fernández y col., 1988).

Se obtiene el suero de sangre colectada en el rastro de la ciudad. La sangre se deja coagular y el suero se separa por sedimentación a 2,000 x g por 15 min. Después se prefiltra con papel Whatman No. 1 y se filtra por una serie de filtros HAWP Millipore (Beford, MA, USA) de 5 a 0.22 μm . Finalmente se esteriliza por filtración utilizando sistemas de filtración al vacío de un litro con filtros de 0.22 μm (Corning, Inc. Corning NY, USA). El suero estéril se descomplementa por calentamiento a 56 °C por 30 minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente y se le añade 25 ml de mezcla de vitaminas (JRH Biosciences, Lenexa, KS) por cada litro de suero. El suero se distribuye en alícuotas de 100 ml, en botellas ámbar, estériles, de vidrio con tapón de rosca y se almacena a -20 °C.

Composición y preparación de soluciones.

Las soluciones que se esterilizarán en autoclave se calentarán a 121 °C/15 min y las que se esterilizarán por filtración se hicieron pasar por membranas Millipore con poros de 0.22 μm de diámetros.

Solución salina balanceada (SSB) 10X.

CaCl₂ 0.07 g; glucosa 1.00 g; NaCl 7.00 g; KCl 0.40 g; MgSO₄ 0.20 g; trizma base 0.12 g; azida de sodio 0.20 g.

Se mezclan y disuelven todos los componentes en agua bidestilada. Se afora la solución a 100 ml y se distribuye en volúmenes de 10 ml a tubos para cultivo, se esteriliza por filtración. Se tapan bien los tubos y se almacenan a -20 °C.

Se prepara la solución de trabajo (290 mOsm/Kg) diluyendo la solución 10X con 90 ml de agua bidestilada estéril.

Solución de Alsever 10X.

Citrato trisódico 5.37 g; ácido cítrico.H₂O 1.87 g; glucosa 5.36 g; NaCl 5.27 g.

Se mezclan y disuelven los componentes con agua bidestilada, se afora la solución a 100 ml y se esteriliza por filtración, a través de un filtro de nitrocelulosa. Después se llenan los tubos para cultivo con 10 ml de esta solución. Se tapan bien y se almacenan a -20 °C. Para preparar la solución de trabajo (290 mOsm/Kg), se descongela el contenido de un tubo de solución 10X y se diluye con 90 ml de agua bidestilada estéril. Esta solución debe usarse inmediatamente.

Solución salina amortiguada de fosfatos (PBS).

NaCl 6.5 g; K₂HPO₄ 2.8 g; KH₂PO₄ 0.5 g.

Se mezclan y disuelven los componentes en 900 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.4 con NaOH 10 N y se afora a 1,000 ml con agua bidestilada. Se ajusta la

osmolaridad a 300 mOsm/Kg con NaCl. Esta solución se distribuye en alícuotas de 10 ml y se esteriliza en autoclave. Los tubos conteniendo la solución se almacenan a temperatura ambiente.

Seroalbúmina bovina fracción V al 25% (SAB).

Se pesan 10 g de seroalbúmina bovina y se disuelven en 40 ml de solución salina isotónica (NaCl al 0.9 %). Se esteriliza por filtración. Se distribuye en alícuotas de 10 ml y se almacena a -20 °C. Cuando se requiera, se añade 1 ml de la mezcla de vitaminas.

Seroalbúmina bovina deslipidizada al 25% (SAB-DL).

Se pesan 10 g de seroalbúmina bovina deslipidizada y se disuelven en 40 ml de solución salina isotónica (NaCl al 0.9 %), se añade 1 ml de la mezcla de vitaminas. La solución se esteriliza por filtración. Se distribuye en alícuotas de 10 ml y se almacena a -20 °C.

Solución de Earle (Eagle, 1959).

Solución 1 de sales.

Solución 1a. Se pesan 9.05 g de NaCl; 0.40 g de KCl ; 0.14 g de Na₂HPO₄ ; se disuelven en 800 ml de agua. Se ajusta el pH a 7.2. La solución se coloca en botellas, en porciones de 64 ml. Se esteriliza por autoclave, se almacena a temperatura ambiente.

Solución 1b. Se pesan 2.0 g de CaCl_2 y se disuelven en 1 l de agua. Esta solución se distribuye en alícuotas de 100 ml. Se esteriliza las botellas conteniendo la solución en autoclave, se almacena a temperatura ambiente.

Solución 1c. Se pesan 2.0 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y se disuelven en 1 l de agua. Esta solución se distribuye en alícuotas de 100 ml. Se esterilizan las botellas conteniendo la solución en autoclave. Se almacena a temperatura ambiente.

Solución de trabajo de sales. Se mezclan antes de añadir el resto de los componentes: 64 ml de la solución 1a; 8 ml de la solución 1b, 8 ml; y 8 ml de la solución 1c.

Soluciones de aminoácidos.

Solución 1 (100 X) de aminoácidos esenciales. Se pesan 1.27 g de L-arginina; 0.38 g de L-histidina.HCl; 0.58 g de L- lisina; 0.52 g de L-leucina; 0.52 g de L-isoleucina; 0.15 g de L-metionina; 0.32 g de L-fenilalanina; 0.48 g de L-treonina; 0.10 g de L-triptófano; 0.46 g de L-valina. Se disuelven en 100 ml de solución 1, calentando a 80 °C. Se esteriliza por filtración. Se distribuye la solución en alícuotas de 10 ml y se almacena en tubos de cultivo envueltos en papel aluminio a 4 °C.

Solución 2 (100 X). Se pesan 0.36 g de L-tirosina; 0.24 g de L-cistina. Se disuelven en 100 ml de HCl 0.1 N. Se calienta ligeramente. Se esteriliza por filtración, se distribuye la solución en alícuotas de 10 ml y se almacena en tubos de cultivo envueltos en papel aluminio a 4 °C.

Solución 3 (100 X). Se pesan 2.29 g de L-glutamina. Se disuelven en 100 ml de solución 1. Se esteriliza por filtración, se distribuye la solución en alícuotas de 10 ml y se almacena en tubos de cultivo envueltos en papel aluminio a 4 °C.

Solución 4 de aminoácidos. Se pesan 0.089 g de L-alanina; 0.150 g de L-asparagina.H₂O; 0.133 g de L-ácido aspártico; 0.147 g de L-ácido glutámico; 0.115 g de L-prolina; 0.105 g de L-serina; 0.075 g de Glicina. Se disuelven en 100 ml de agua bidestilada. Se esteriliza por filtración, se distribuye la solución en alícuotas de 10 ml y se almacena en tubos de cultivo envueltos en papel aluminio a 4 °C.

Solución de trabajo de Earle para sustituto de suero.

Se añade a cada botella de la solución 1, 2.5 ml de cada una de las soluciones 1, 2, 3, y 4 de aminoácidos y 2.5 ml de la mezcla de vitaminas.

PACSR.

La Tabla 2 muestra la composición del PACSR. Cada una de las soluciones del sustituto de suero se preparó como se menciona arriba. El PACSR se prepara de la siguiente forma; a la solución de trabajo de Earle se le añade 1 ml de LCR. De este solución se añaden 0.5 ml a cada tubo de cultivo conteniendo 5 ml del medio basal.

Solución de vitaminas.

Esta solución está compuesta por dos mezclas de vitaminas; la mezcla vitamínica 107 (Diamond 1968) y la mezcla vitamínica-Tween 80 (Diamond y col, 1978).

Mezcla vitamínica 107

A. Solución de vitaminas B hidrosolubles.

Solución a. Se disuelven en agua bidestilada hirviendo, 62.5 mg de niacina y 125 mg de ácido p-aminobenzoico. Se afora a 150 ml.

Solución b. Se disuelven en agua bidestilada, 62.5 mg de niacinamida; 62.5 mg de hidrocloreuro de piridoxina; 62.5 mg de hidrocloreuro de piridoxal; 25 mg de hidrocloreuro de tiamina; 25 mg de pantotenato de calcio; 125 mg de I-inositol y 1,250 mg de cloruro de colina y se afora a 150 ml.

Solución c. Se disuelven 25 mg de riboflavina en 75 ml de agua bidestilada con la ayuda de NaOH 0.1 N añadiéndolo gota a gota y se afora a 100 ml.

Solución de vitaminas B. Se mezclan las soluciones a, b y c. Se afora a 500 ml con agua bidestilada.

B. Solución de biotina.

Se disuelven 30 mg de D-biotina en 200 ml de agua bidestilada con la ayuda de NaOH 0.1 N y se afora a 300 ml.

C. Solución de ácido fólico.

Se disuelven 30 mg de ácido fólico en 200 ml de agua bidestilada con la ayuda de NaOH 0.1 N y se afora a 300 ml.

D. Solución de vitaminas liposolubles (A, D y K).

Solución a. Se disuelven 300 mg de vitamina D₂ (calciferol) en 63 ml de alcohol etílico al 95 % (v/v). En esta solución se disuelven 300 mg de vitamina A.

Solución b. Se disuelven 60 mg de vitamina K (menadiona bisulfito de sodio) en 300 ml de una solución acuosa de Tween 80 al 5 % (v/v).

La solución b se mezcla con la solución a y el volumen se lleva a 3,000 ml con agua bidestilada.

E. Solución de vitamina E.

Se disuelven 25 mg de vitamina E (acetato de alfa tocoferol) en 250 ml de agua bidestilada.

Mezcla de trabajo de la mezcla vitamínica 107.

Se mezclan las soluciones estándar en las siguientes proporciones: 500 ml de la solución de vitaminas B hidrosoluble; 250 ml de la solución de biotina; 250 ml de la solución de ácido fólico; 2,500 ml de la solución de las vitaminas liposolubles y 250 ml de la solución de vitamina E. La mezcla completa se esteriliza por filtración y se almacena en la obscuridad a -20 °C.

Mezcla vitamínica-Tween 80.

Solución a. Mezcla vitamínica 107.

Solución b. Se disuelven 40 mg de vitamina B₁₂ en 40 ml de agua bidestilada y se lleva a 100 ml con agua bidestilada.

Solución c. Se disuelven 100 mg de DL-6, 8 ácido tióctico en 100 ml de alcohol etílico absoluto.

Solución d. Se disuelven 50 g de tween 80 en 100 alcohol etílico absoluto.

Mezcla de trabajo de la mezcla de vitaminas-Tween 80. Se mezclan 1,000 ml de la solución a; 12 ml de la solución b; 4 ml de la solución c; 4 ml de la solución d y 180 ml de agua bidestilada. Se esteriliza por filtración y se almacena a -20 °C en la oscuridad.

Soluciones de lípidos presentes en el LCR. Las concentraciones de las soluciones están hechas de acuerdo a las mencionadas por el fabricante (Sigma Chemical Co.) (10X).

Solución de colesterol (COL): pesar 114 mg de colesterol; Solución de fosfatidilcolina (FC): pesar 73.33 mg de fosfatidilcolina; Solución de lisofosfatidilcolina (LFC): pesar 10.90 mg de lisofosfatidilcolina; Solución de esfingomielina (ESM): pesar 28.70 mg de esfingomielina; Solución de ácido linoleico (ALO): pesar 63.750 mg de ácido linoleico; Solución de ácido araquidónico (ARA): pesar 19.2 mg de ácido araquidónico; Solución de ácido linolénico (ALOL): pesar 18.50 mg de ácido linolénico; Solución de ácido oleico (AO): pesar 18.50 mg de ácido oleico; Solución de ácido docohexaenoico (DOCO): pesar 18.50 mg de ácido docohexaenoico.

Todos los lípidos se disuelven en alcohol etílico absoluto (0.5 ml), después con agitación vigorosa se mezclan en el medio de cultivo (9.5 ml). La concentración final del etanol no debe ser mayor del 1 %. De estas soluciones se añaden 50 μ l a los tubos de cultivo para determinar su eficacia en mantener el crecimiento amibiano.

Mezcla de lípidos (Tabla 3).

Las mezclas de lípidos se encuentran en la tabla 3. Los lípidos utilizados para hacer las mezclas, son los mencionados en el párrafo anterior.

Tabla 2. Composición del sustituto de suero (PACSR).

Compuesto	Concentración (mg/l)	Compuesto	Concentración (mg/l)
<i>L-aminoácidos</i>		<i>Sales</i>	
Arginina	31.75	NaCl	724.00
Lisina	9.50	KCl	32.00
Leucina	13.00	Na ₂ HPO ₄	11.20
Histidina	9.50	CaCl ₂	16.00
Isoleucina	13.00	MgSO ₄ .7H ₂ O	16.00
Metionina	3.75		
Fenilalanina	8.00	<i>Vitaminas</i>	
Treonina	12.00	Acido p-aminobenzoico	832
Triptofano	2.50	d-biotina	165
Valina	11.50	Cloruro de colina	8,320
Tirosina	9.00	Acido folico	165
Cistina	6.00	i-inositol	832
Glutamina	57.25	Niacina	415
Alanina	2.225	Niacinamida	415
Acido aspártico	3.325	Pantotenato de calcio	165
Prolina	2.875	Piridoxal.HCl	415
Asparagina	3.75	Riboflavina	165
Acido glutámico	3.675	Tiamina.HCl	165
Serina	2.625	Calciferol (D ₂)	1,650
<i>Otros aminoácidos</i>		Bisulfito de menadiona	333
Glicina	1.875	Acetato de tocoferol	165
<i>Lípidos</i>	<i>Concentración (ml/l)</i>	Vitamina A, retinol	1,650
LCR	10.00	Vitamina B ₁₂	120
Tween 80	0.050	DL-6,8 ácido tioctico	100

Tabla 3. Análisis del efecto de los componentes lípidicos del LCR sobre el crecimiento de *E. histolytica* en un medio libre de suero*.

Mezcla I	COL	FC	LFC	ESM	ALO	ARA	ALOL	AO	DOCO
Mezcla II	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mezcla III	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Mezcla IV	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Mezcla V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Mezcla VI	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Mezcla VII	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Mezcla VIII	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Mezcla IX	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Mezcla X	-	+	+	+	+	+	+	+	+

*Concentración final en el medio de cultivo a la que se probaron cada uno de los lípidos en mg/ml: COL, 0.10; FC, 0.067; LFC, 0.010; ESM, 0.026; ALO, 0.058; ARA, 0.017; ALOL, 0.017; AO, 0.017, DOCO, 0.017.

Las soluciones de los lípidos se añaden a la mezcla de aminoácidos de Earle y se agita vigorosamente, a la concentración señalada arriba. Se pesan 114 mg de colesterol; Solución FC: Se pesan 73.33 mg de fosfatidilcolina; Solución LFC: se pesan 10.90 mg de lisofosfatidilcolina; Solución ESM: se pesan 28.70 mg de esfingomielina; Solución ALO: se pesan 63.750 mg de ácido linoleico; Solución ARA: se pesan 19.2 mg de ácido araquidónico; Solución ALOL: se pesan 18.50 mg de ácido linolénico; Solución AO: se pesan 18.50 mg de ácido oleico; Solución DOCO: se pesan 18.50 mg de ácido docohexaenoico.

METODOS.

Cultivos amibianos axénicos.

Las cepas HK9:NIH, HM1:IMSS y HM3:IMSS de *Entamoeba histolytica* se mantuvieron en cultivo en el medio PEHPS (Saíd-Fernández y col, 1988) y la cepa HM1:IMSS en TYI-S-33 (Diamond y col, 1978) incubándolas a 36.5 °C (Incubadora National Heinicke Co. OR USA). Antes de cada resiembra los cultivos se observaron en un microscopio invertido (Biovert, Reichert, Austria) para comprobar el buen estado de las amibas. El cultivo que mostró la mejor densidad de trofozoítos y el mejor aspecto de éstos fue colocado en agua-hielo por 10 minutos y el número de amibas se determinó utilizando un hemocitómetro, e inoculando 10×10^3 trofozoítos/ml a cada uno de los tres tubos con medio fresco. Los cultivos se sembraron cada 72 h, en fase log de crecimiento (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros típicos de crecimiento de tres cepas axénicas de *Entamoeba histolytica* en dos medios de cultivo.

CEPA	MEDIO	RENDIMIENTO ^a	Td ^b
	PEHPS		
HK9		310.84 ± 17.95	16.98 ± 0.56
HM1		196.70 ± 24.50	16.43 ± 0.62
HM3		232.10 ± 10.63	15.44 ± 0.71
	TYI-S-33		
HM1		156.25 ± 12.05	18.76 ± 0.81

^aMedia \pm desviación estándar, $\times 10^3$ trofozoítos/ml.

^bTiempo de duplicación expresado en h.

Métodos de Cultivo.

Los cultivos de referencia fueron mantenidos en el medio PEHPS como ya se describió previamente (Saíd-Fernández y col, 1988). Tres tubos fueron inoculados con 10×10^3 trofozoítos/ml, creciendo en su fase logarítmica. Todos los cultivos analizados en este estudio fueron incubados a 36.5 °C.

Efecto de concentraciones variables de nutrientes añadidos al PEHP o PEHP-SBS.

En la primera parte de este trabajo se realizaron los experimentos con trofozoítos de la cepa HK9:NIH de *E. histolytica*, con inóculos de 10×10^3 trofozoítos/ml cada 72 h e incubándolos a 36.5 °C. A los tubos de cultivo conteniendo 5 ml de PEHP y 60 μ l de SBS se les añaden volúmenes variables de las siguientes soluciones: (a) SAB (10-500 μ l), (b) SAB-LAG (10-200 μ l), (c) la solución de aminoácidos de Earle (100-1,000 μ l). En los experimentos llevados a cabo con diferentes volúmenes de la solución de Earle, se le añadieron al medio basal PEHP 9.2 g de glucosa/l en lugar de los 6.0 g de glucosa/l usuales. Por otra parte, cuando se determinó el efecto de concentraciones variables de glucosa en el crecimiento de las amibas, el medio basal PEHP fue preparado con concentraciones superiores de glucosa (6.0 a 12.4 g/l). Entonces a este medio basal se le añadieron 60 μ l de SBS y 25 μ l de la solución SAB-LAG.

Análisis del efecto de los componentes del LCR en forma individual en el crecimiento de *E. histolytica*.

Se determinaron el efecto de todos los componentes del LCR en forma individual para probar si eran capaces de sostener el crecimiento amibiano en el medio ausente de suero, añadidos a la mezcla de aminoácidos de Earle y la mezcla vitamínica.

Para probar los lípidos en forma individual se hicieron soluciones concentradas de cada uno de los lípidos y se les añadió a cada tubo 5 μ l de estas soluciones. Incubándolas en presencia de los trofozoítos de *E. histolytica* a 36.5 °C por 72 h.

Además de probarse en forma individual, también se determinó el efecto, sobre el crecimiento de las amibas, de diferentes mezclas de lípidos (Tabla 3).

También se probaron en forma individual otro de los componentes del LCR y las lipoproteínas. Se utilizaron las siguientes concentraciones: 120, 240, 360, 480, 600, 720, 960 y 1200 μ g/ml.

Tabla 5. Concentración de los componentes presentes en el LCR*.

Componente	Concentración (mg/ml)
Colesterol	11.4
Fosfatidilcolina	7.34
Liso fosfatidilcolina	1.09
Esfingomileina	2.87
Acido linoleico	6.37
Acido araquidónico	0.30
Acidos grasos polinsaturados	7.42
Lipoproteínas	23.00

*Concentraciones reportadas por el fabricante (Sigma Chemical Co.)

Cultivos masivos.

Los cultivos masivos se obtuvieron utilizando frascos para cultivo en suspensión (spinners) de 900 ml de capacidad. El inóculo fue de 5×10^3 trofozoítos/ml en 600 ml de medio basal (PEHP) y 60 ml de suero de bovino (PEHPS). Los cultivos se mantuvieron estáticos por 48 h y por 24 h en agitación a 36.5 °C. (Saíd-Fernández y Mata-Cárdenas, 1992).

Obtención de la fracción vesicular (P30).

Para la obtención de la P30, se cosecharon las amibas cultivadas en spinners. Para ello los spinners se enfriaron mediante inmersión en agua-hielo por 30 minutos, su contenido se vació en botellas de polipropileno con tapón de rosca de 1000 ml y se centrifugaron a 600 X g por 10 min a 4 °C (Damon IEC Div. MA USA) se lavó la pastilla dos veces con SSB. La pastilla se resuspendió en dos volúmenes de SSB y se homogeneizó con 120 golpes de un homogenizador Elvehjem-Potter. Después de este tratamiento no se observaron células enteras. El producto resultante es el extracto total (ET).

A partir de ET, obtuvimos tres fracciones amibianas: nuclear (N), vesicular (P30) y sobrenadante postvesicular (S30), mediante centrifugación diferencial, (Figura 1). Durante este proceso enfriamos todas las muestras en agua-hielo 4 °C (Saíd-Fernández y López-Revilla 1982).

Cuantificación de proteínas (Lowry y col, 1951).

La concentración de proteínas en los extractos amibianos fue determinada mediante el método de Lowry y col. (1951).

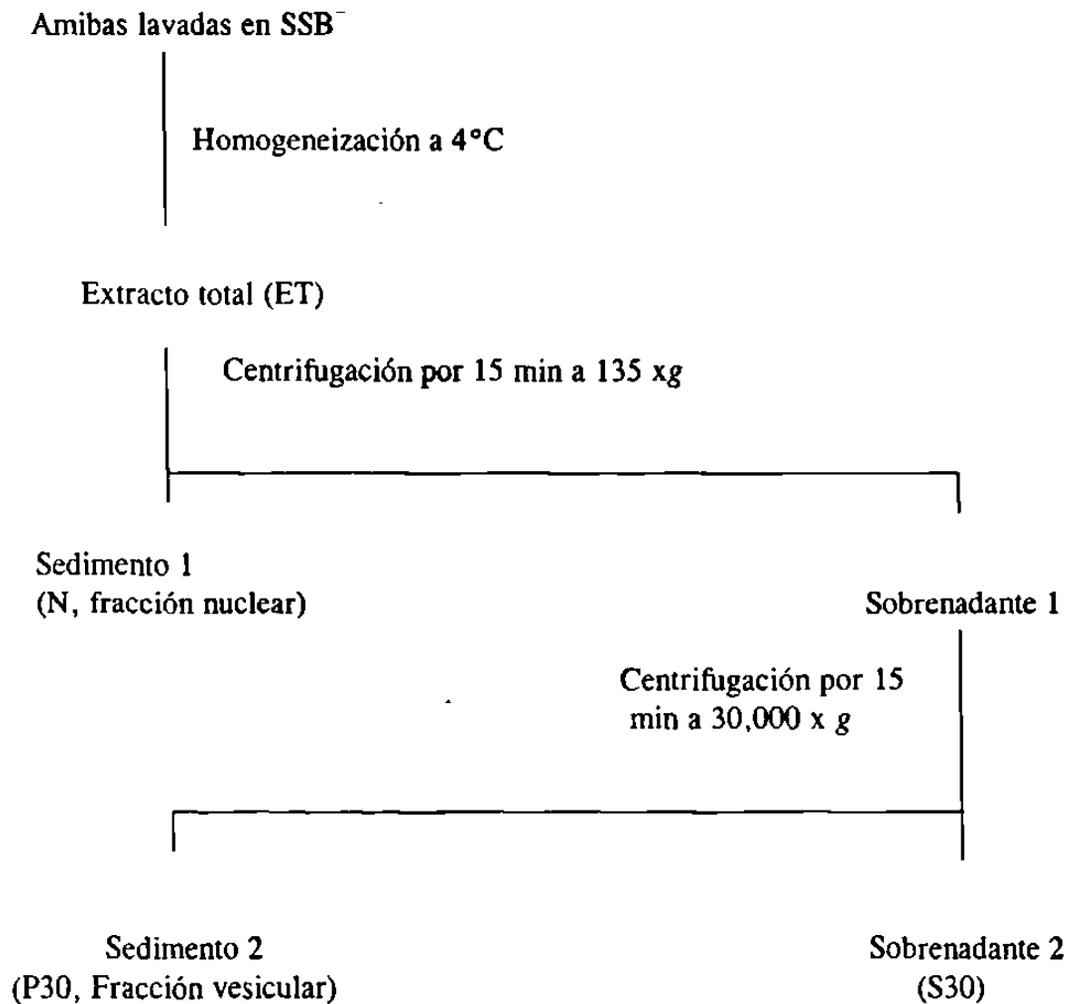


Figura 1. Obtención de las fracciones subcelulares amibianas (Saíd-Fernández y López-Revilla, 1982).

En tubos de ensayo se colocaron muestras de 0.2 ml (por triplicado), conteniendo entre 20 y 100 μg de proteínas; se agregó 1 ml de reactivo C (1 ml de tartrato de sodio al 1 % y sulfato cúprico al 0.5 %, diluido en 50 ml de carbonato de sodio al 2 % en hidroxido de sodio 0.1 *N*), se agitan las mezclas con un vórtex y se dejan 10 min a temperatura ambiente; después se añade a cada tubo 0.1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu 2 *N* (titulado con ácido clorhídrico), agitando inmediatamente con un vórtex, se incuban las muestras por 30 min a temperatura ambiente y la absorbancia a 750 nm se mide en un espectrofotómetro (Modelo PM QIII, Carl Zeiss). En cada análisis se calcula la masa de proteínas con la ecuación obtenida de la curva tipo preparada con seroalbúmina bovina fracción V.

Obtención de eritrocitos de rata.

Colección de sangre.

Colectamos la sangre de rata mediante punción de arteria aorta. La sangre se diluyó con un volumen igual de solución de Alsever.

Lavado y almacenamiento de eritrocitos.

Inmediatamente después del sangrado, se obtuvo el paquete de eritrocitos por centrifugación, 9 min a 600 $\times g$ y 4°C. El paquete celular se lavó dos veces con PBS y una vez con SSB. Después de cada centrifugación eliminamos por aspiración el sobrenadante y la capa de leucocitos, depositado sobre la pastilla de eritrocitos. Después de comprobar el buen aspecto microscópico de los eritrocitos, se dividieron los paquetes celulares en alícuotas de 1 ml y se almacenaron hasta por una semana.

Cuantificación de la actividad hemolítica de los extractos amibianos (Saíd-Fernández y López-Revilla, 1982)

Determinamos la actividad hemolítica como liberación porcentual de hemoglobina de las mezclas de eritrocitos con dosis variables de P30. En tubos de polipropileno (Eppendorf de 1.5 ml) mezclamos 25 μ l de eritrocitos de rata al 3 %, y dosis variables de P30, ajustamos a 50 μ l con SSB todas las mezclas de ensayo. Las mezclas de ensayo de P30 de cultivos de trofozoítos cultivados en suero, en presencia de PACSR o en presencia de lipoproteínas, y las incubamos a 37 °C en un baño de agua por tiempos variables. Después añadimos 1 ml de PBS, centrifugamos los tubos por 9 min, a 600 X g en una centrifuga Sorvall, modelo RC-3B y medimos la absorbancia de los sobrenadantes a 415 nm.

Calculamos la liberación porcentual de hemoglobina dividiendo el promedio de la densidad óptica de los problemas, entre el promedio de la densidad óptica de los eritrocitos lisados por choque hipotónico (equivalente al 100 %), y multiplicando el cociente por 100. Graficamos el porcentaje de hemólisis contra dosis variables de P30. En la recta de estas curvas determinamos por interpolación la dosis hemolítica media (DH₅₀), como la concentración de muestra que causó la liberación del 50 % de hemoglobina (López-Revilla y Saíd-Fernández, 1980).

Inducción de absceso hepático amibiano en hámsters (González-Garza y col., 1996).

Los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal, con una solución de 0.063 g/ml de pentobarbital sódico (Smithkline Norden, México) de uso veterinario, con jeringa desechable de 1 ml y aguja calibre No. 23 en dosis de 42 mg/Kg de peso corporal. Con esta

dosis se indujo una anestesia profunda en 5 minutos. Después se procedió a rasurar el vientre del hámster y desinfectar el área con una solución acuosa de cloruro de benzalconio al 0.25 %. Inmediatamente después se hizo una incisión de 1.5 cm en la línea media, abajo del esternón con tijeras y se expuso el hígado. Se inocularon 10^6 amibas, suspendidas en 0.1 ml de medio PEHP basal, directamente en el lóbulo derecho del hígado, con una aguja calibre No. 23. Después de la inoculación se limpió bien la herida producida por la aguja, con un hisopo estéril de algodón, empapado en solución salina isotónica, y se suturó la incisión, mediante surgete continuo, abarcando los planos musculares y seroso de la piel, con seda estéril del 00.

Se inocularon trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS de cultivos suplementados con: Suero (PEHPS), con el sustituto de suero (PEHP-PACSR) y con trofozoítos crecidos únicamente en presencia de lipoproteínas (PEHP-LIPO).

Métodos estadísticos.

Para determinar la utilidad de los diversos compuestos en el crecimiento de *E. histolytica in vitro* se hicieron mínimo 5 experimentos independientes, cada uno por triplicado. Se promediaron los rendimientos obtenidos durante los diferentes experimentos y las medias se compararon contra los cultivos testigos (PEHPS o PEHP-SBS) mediante análisis de varianza.

La inducción de absceso hepático en hámsters se determinó mediante la confirmación de la presencia del absceso por laparotomía a los 7 días de haberse inoculado. Se determinó

el porcentaje de los positivos de cada uno de los grupos probados y se determinó la significancia entre ellas mediante la Z de proporciones (Chou, 1977).

RESULTADOS

Efecto de SAB más vitaminas, LCR y LCR + vitaminas sobre la sobrevivencia de los trofozoítos de *E. histolytica*.

Cuando incubamos a 36.5 °C los cultivos de *E. histolytica* en PEHP o en PEHP más SAB y vitaminas, los trofozoítos resistieron de 12 a 18 h y luego se lisaron. Por otra parte, las amibas incubadas en PEHP + LCR o en PEHP + LCR + vitaminas (SBS) permanecieron vivas y de apariencia saludable por lo menos las 72 h que duró nuestra observación. Sin embargo los rendimientos de estos cultivos (12.2 ± 5.0 y $12.7 \pm 6.4 \times 10^3$ trofozoítos/ml, respectivamente) no fueron diferentes significativamente al número de trofozoítos inoculado (10×10^3 trofozoítos/ml).

Cuando al LCR o al SBS le añadimos SAB al 10 % encontramos rendimientos 6 veces mayores ($81.87 \pm 36.4 \times 10^3$ trofozoítos/ml) y 11 veces mayores respectivamente ($140.26 \pm 50.4 \times 10^3$ trofozoítos/ml) ($p < 10^{-6}$) con respecto al SBS. Cuando estos rendimientos se compararon contra el testigo, resultaron ser 67 y 44 % menores que el testigo (249.43 ± 40.65 trofozoítos/ml) cultivado en presencia de suero (PEHPS) (Figura 2).

De los resultados obtenidos se observa que la mezcla de lípidos comercial (LCR), la seroalbúmina bovina al 10 % y la mezcla de vitaminas (Diamond, 1978) pueden sustituir al suero para mantener el crecimiento de las amibas.

Curva dosis respuesta de SAB en presencia de SBS.

Los promedios de los rendimientos que alcanzaron las amibas en presencia de concentraciones variables de SAB presentaron una distribución monomodal en función de

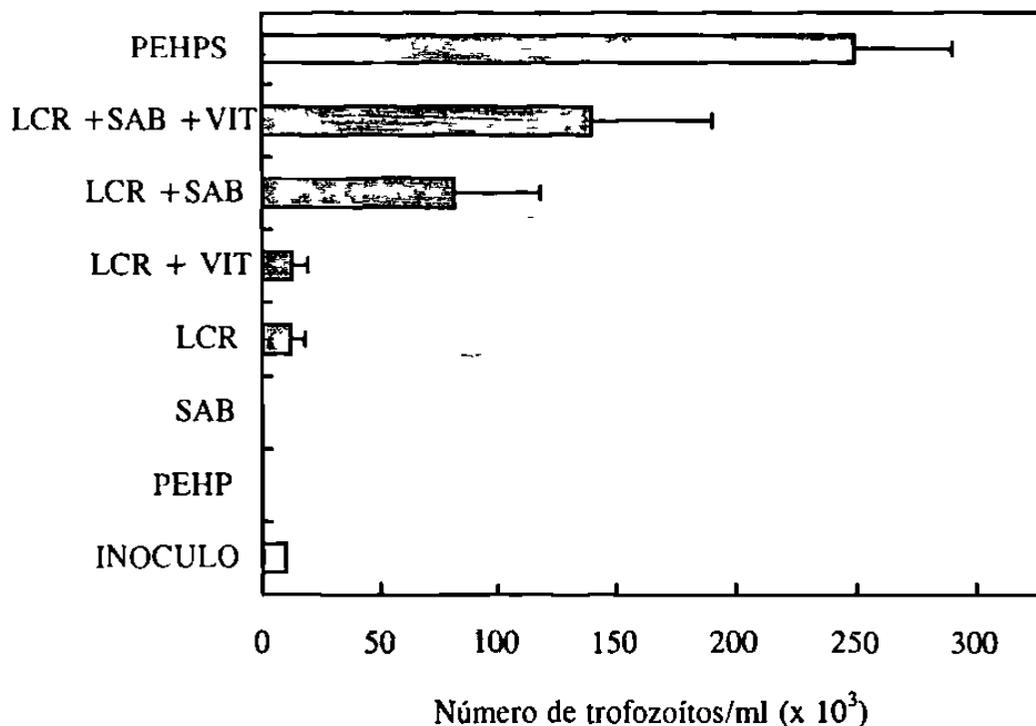


Figura 2. Efecto de la mezcla de lípidos (LCR), con y sin vitaminas, y/o con seroalbúmina bovina al 10 % sobre el crecimiento de la cepa HK9:NIH en ausencia de suero. Se determinó el efecto del LCR (10 ml/l) en el crecimiento de *E. histolytica* cepa HK9:NIH y seroalbúmina bovina al 10 % en forma individual y en combinación con inóculos de 10×10^3 trofozoítos/ml. Cada barra corresponde al promedio y desviación estándar de 8 experimentos independientes por triplicado.

la dosis de SAB. Observamos el rendimiento promedio más alto en cultivos crecidos en presencia de 2.5 g/l ($140.9 \pm 42.1 \times 10^3$ trofozoítos/ml). Este valor fue 11.6 mayor ($p < 10^{-6}$)

que el obtenido con PEHP-SBS y 42.8 % menor comparado con los rendimientos logrados por los cultivos control mantenidos en PEHPS ($246.2 \pm 54.7 \times 10^3$ trofozoítos/ml) (Figura 3).

Curva dosis respuesta de SAB deslipidizada (SAB-DL) en presencia de SBS.

La figura 4 muestra que los rendimientos promedio de *E. histolytica* presentaron una tendencia de distribución monomodal en función de la dosis de SAB-DL. No obstante no encontramos diferencias significativas al comparar entre sí los rendimientos alcanzados con las dosis probadas de SAB-DL. Observamos el mayor rendimiento ($136.7 \pm 43 \times 10^3$ trofozoítos/ml) en cultivos crecidos con 1.25 g de SAB-DL. Este valor fue 9.3 a 11.4 veces mayor (dependiendo de la dosis probada) que el obtenido con PEHP-SBS ($p < 10^{-6}$); y 42.6 % menor que los rendimientos logrados por los cultivos control mantenidos en PEHPS (Figura 4). Las diferencias entre los rendimientos de cultivos con 2.5 g de SAB/l y 1.25 g de SAB-DL/l no fue significativa ($p = 0.69$).

Efecto promotor del crecimiento de la glucosa.

Los rendimientos de cultivos mantenidos en PEHP-SBS más SAB-DL aumentaron significativamente con respecto a los cultivos crecidos en medio sin glucosa adicionada (de 22 al 41 %). Por otra parte, no observamos diferencias significativas cuando comparamos entre sí los rendimientos obtenidos con 0.2 a 6.4 g/l de glucosa adicional. Observamos los

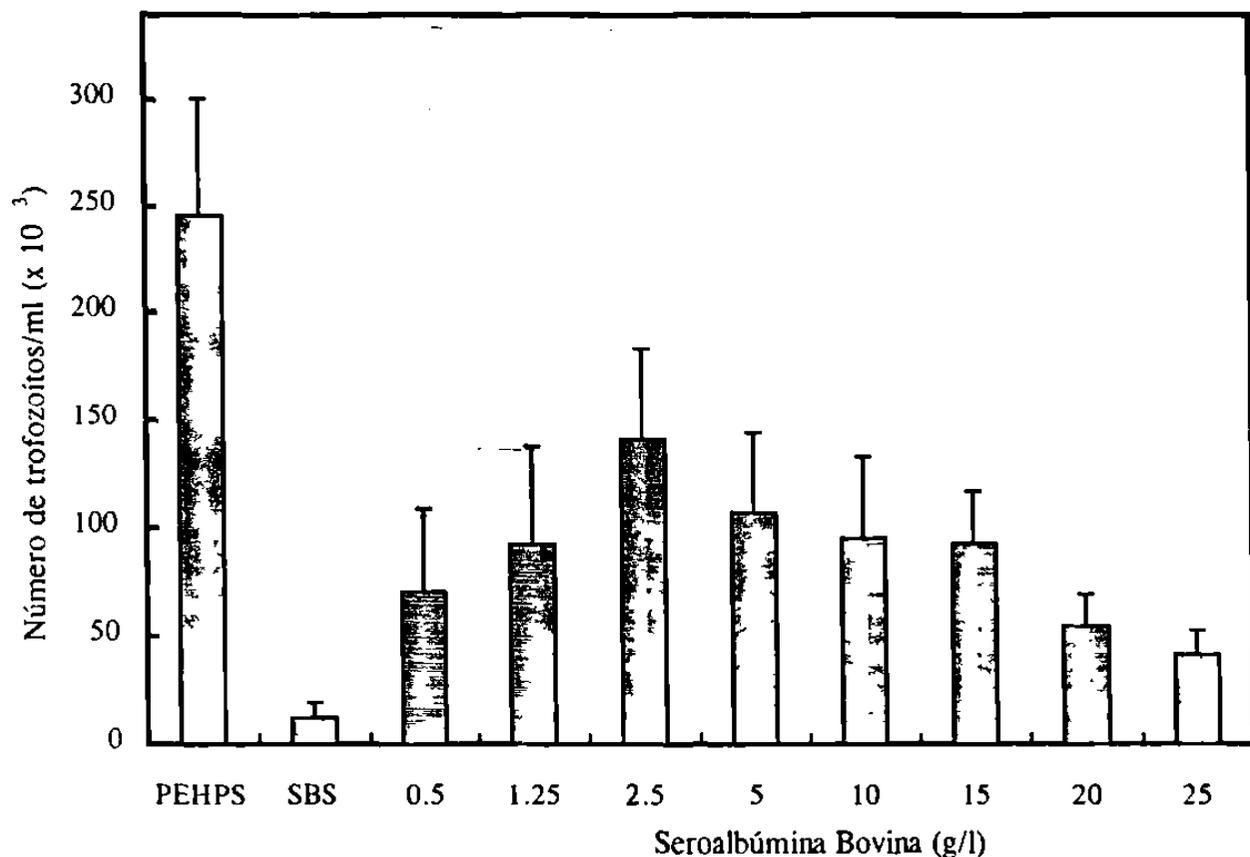


Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina fracción V, añadida al SBS ($50 \mu\text{l}$ de LCR más $10 \mu\text{l}$ de mezcla vitamínica) sobre el crecimiento de la cepa HK9:NIH. Se determinó el efecto de diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina fracción V, utilizando inóculos de 10×10^3 trofozoítos/ml. Cada barra corresponde al promedio \pm desviación estándar de 8 experimentos independientes por triplicado.

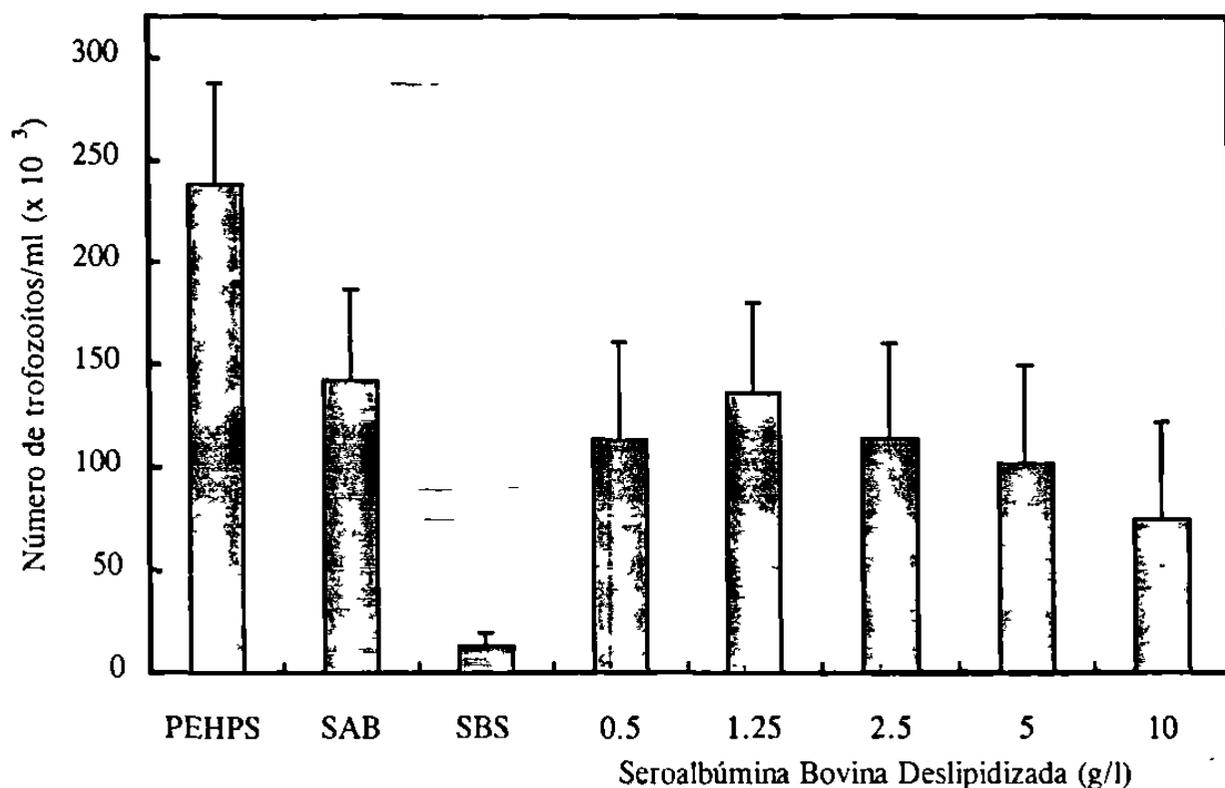


Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina fracción V deslipidizada (SAB-DL), añadida al SBS (50 μ l de LCR más 10 μ l de mezcla vitamínica) sobre el crecimiento de la cepa HK9:NIH. Se determinaron el efecto de diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina fracción V deslipidizada, utilizando inóculos de 10×10^3 trofozoitos/ml. Cada barra corresponde al promedio \pm desviación estándar de 8 experimentos independientes por triplicado.

rendimientos más alto en los cultivos mantenidos en PEHP con 3.2 g/l de glucosa adicional. Al comparar la densidad de los cultivos alcanzada con 3.2 g/l de glucosa adicional con la de los testigos sin glucosa añadida observamos también mayor significancia (Tabla 6).

Los rendimientos alcanzados por los cultivos de *E. histolytica* mantenidos en PEHP-SBS más SAB-DL y 3.2 g/l de glucosa adicional ($244.27 \pm 33.75 \times 10^3$ trofozoítos/ml) fueron los más altos observados en todos los medios experimentales, libres de suero, probados en este trabajo. Estos rendimientos fueron 15.8 % menores que los alcanzados por los testigos mantenidos en PEHPS ($267.93 \pm 58.51 \times 10^3$ trofozoítos/ml). Cuando se compararon ambas medias no hubo significancia estadística ($p = 0.8$).

Tabla 6. Efecto de diferentes concentraciones de glucosa adicionada al PEHP y su relación sobre el crecimiento de la cepa HK9:NIH^a.

Glucosa adicional (g/l)	Rendimiento (trofozoítos/ml $\times 10^3$) ^c		significancia ^b (p)
	absoluto	relativo	
0.0	157.80 \pm 39.71	1.00	
0.4	222.43 \pm 41.28	1.41	1.33 $\times 10^{-6}$
0.8	210.36 \pm 42.56	1.33	7.59 $\times 10^{-5}$
1.6	215.95 \pm 53.08	1.37	6.72 $\times 10^{-5}$
3.2 ^d	225.43 \pm 37.65	1.43	< 10^{-6}
6.4	192.93 \pm 50.79	1.22	8.00 $\times 10^{-3}$

^aCultivo de amibas mantenidos en PEHP-SBS más 1.25 g/l de SAB-DL. Este medio contiene 6.0 g/l de glucosa más la concentración de glucosa indicada.

^bComparado con rendimientos de cultivos mantenidos en PEHP-SBS más 1.25 g de SAB-DL (seroalbúmina deslipidizada) con 0 g de glucosa adicional.

^cPromedio \pm desviación estándar.

^dConcentración de glucosa donde se obtuvo más alto rendimiento.

Efecto de diferentes volúmenes de la solución de Earle en lugar de SAB-DL.

Los trofozoítos crecidos en PEHP-SBS con volúmenes variables de la solución de aminoácidos de Eagle (20-200 ml/l) alcanzaron densidades del 20 al 38 % mas bajas que los cultivos mantenidos en PEHP-SBS más 2.5 g/l de SAB-DL más 9.2 g/l de glucosa. Por otra parte, los rendimientos de cultivos crecidos en la presencia de la solución de Earle fueron 8.8 a 10.3 veces más altos que los testigos crecidos en PEHP-SBS. No observamos diferencias significativas cuando comparamos entre sí los resultados obtenidos con todas las dosis de la solución de Earle. Los resultados obtenidos con 80 ml/l de la solución de Earle fueron los más cercanos a los obtenidos con 1.25 g/l de SAB-DL (Tabla 7) su diferencia resultó significativa ($p = 0.02$). Por otro lado, los valores obtenidos en PEHP-SBS más 80 ml/l de la solución de Earle ($125.46 \pm 42.51 \times 10^3$ trofozoítos/ml) fueron 50 % menores que las densidades obtenidas con PEHPS ($296.08 \pm 54.76 \times 10^3$ trofozoítos/ml).

Crecimiento de tres cepas de *E. histolytica* en PEHP-PACSR.

Los trofozoítos de las cepas HK9:NIH, HM1:IMSS y HM3:IMSS crecieron bien en PEHP-PACSR durante los programas de subcultivo a corto y largo plazo (Tablas 8 y 9). Después de 15 días de subcultivo en PEHP-PACSR los rendimientos de HK9:NIH fueron cuantitativamente comparables con los testigos mantenidos en PEHPS; mientras que los rendimientos de HM1:IMSS y HM3:IMSS fueron 56 % y 62 % menores que los testigos, respectivamente (Tabla 8).

Tabla 7. Efecto de volúmenes variables de la solución de aminoácidos de Earle sobre el crecimiento de la cepa HK9:NIH.

Medio ^a	Rendimiento (trofozoítos/ml x 10 ³) ^c		Significancia ^b (p)
	absoluto	Relativo	
LCR-SAB-DL	155.81 ± 36.38	1.00	
LCR-solución de AA (ml/l)			
0	12.73 ± 6.46	0.11	< 10 ⁻⁶
20	107.43 ± 31.50	0.69	6.31 x 10 ⁻⁵
40	105.55 ± 30.43	0.68	9.51 x 10 ⁻⁵
80	125.46 ± 42.51	0.80	2.15 x 10 ⁻²
120	116.51 ± 49.42	0.75	7.32 x 10 ⁻³
200	97.02 ± 49.27	0.62	1.01 x 10 ⁻⁴

^aTodos los medios utilizados en este experimento fueron preparados con 9.2 g/l de glucosa.

^bComparado con rendimientos de cultivos mantenidos en PEHP-LCR-1.25 g de SAB-DL adicionado con 9.2 g de glucosa/l.

^cPromedio ± desviación estándar.

Tabla 8. Rendimientos de *E. histolytica* crecidos en PEHP-PACSR o TYI-PACSR después de un programa de subcultivo a plazo corto^a

Cepa	Medio	Rendimiento	
		absoluto	relativo
HK9:NIH	PEHPS	198 ± 24	1.00
	PEHP-PACSR	242 ± 69	1.22
HM3:IMSS	PEHPS	232 ± 11	1.00
	PEHP-PACSR	89 ± 6	0.38*
HM1:IMSS	PEHPS	197 ± 25	1.00
	PEHP-PACSR	87 ± 4	0.44*
HM1:IMSS	TYI-S-33	156 ± 12	1.00
	TYI-PACSR	118 ± 49	0.75

^aCinco resiembras, cada 72 h.

^bTrofozoítos/ml x 10³, promedio ± desviación estándar.

*p < 0.001

Tabla 9. Rendimientos de *E. histolytica* crecidos en PEHP-PACSR o TYI-PACSR después de un programa de subcultivo a plazo largo^a

Cepa	Medio	Rendimiento	
		Absoluto	relativo
HK9:NIH	PEHPS	307 ± 97	1.00
	PEHP-PACSR	243 ± 81	0.81
HM3:IMSS	PEHPS	270 ± 63	1.00
	PEHP-PACSR	170 ± 13	0.63*
HM1:IMSS	PEHPS	216 ± 78	1.00
	PEHP-PACSR	164 ± 33	0.76
HM1:IMSS	TYI-S-33	191 ± 54	1.00
	TYI-PACSR	163 ± 50	0.85

^a160 resiembras, cada 72 h.

^bTrofozoítos/ml x 10³, promedio ± desviación estándar.

*p < 0.001.

Al término del programa de subcultivo a largo plazo en PEHP-PACSR los rendimientos fueron 29 % (HK9:NIH), 24 % (HM1:IMSS) y 37 % (HM3:IMSS) menores que los cultivos mantenidos en PEHPS, pero solo los de HM3:IMSS fueron significativamente diferentes (Tabla 9) ($p < 0.001$).

Crecimiento de la cepa HM1:IMSS en TYI-PACSR.

Los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS, mantenida en TYI-PACSR por 15 días alcanzó rendimientos 24 % menores que en TYI-S-33. Tales diferencias no fueron significativas ($p = 0.3$; Tabla 8). Después de 16 meses en las mismas condiciones de cultivo, esta cepa mostró rendimientos 15 % menores que los controles. No encontramos diferencias significativas entre los rendimientos de las amibas mantenidas en TYI-PACSR y los cultivos mantenidos en TYI-S-33 ($p = 0.3$; Tablas 8 y 9).

Efecto de los lípidos individuales sobre el crecimiento de *E. histolytica*.

Al probar el efecto de los lípidos que contiene el LCR en forma individual, encontramos que ninguno de los lípidos probados fue útil para mantener el crecimiento de *E. histolytica*. Las amibas se lisaron en presencia de cualquiera de los lípidos probados dentro de las primeras 24 horas.

Efecto de mezclas de lípidos sobre el crecimiento de *E. histolytica*.

Debido a que los lípidos individuales no soportaron el crecimiento de las amibas, entonces probamos a las amibas con grupos de lípidos, y diseñamos para este propósito

mezclas de lípidos, donde probamos al grupo que contenía a todos los lípidos contra las mezclas que contenían todos los lípidos excepto uno (Tabla 3).

Los cultivos amibianos se lisaron dentro de las 24 h en cualquiera de las mezclas probadas.

Efecto de las lipoproteínas sobre el crecimiento de *E. histolytica* cepa HK9:NIH.

En los experimentos anteriores se demostró que los lípidos, probados individualmente y en mezclas, no resultaron satisfactorios para el crecimiento de *E. histolytica* en cultivo y que el último componente del LCR por probar eran las lipoproteínas, por lo que decidimos probar éstas como posibles candidatos de fuente de lípidos.

Para realizar este experimento probamos distintos grupos, todos los componentes del PACSR (aminoácidos y LCR) o los componentes del LCR.

Los grupos que diseñamos y probamos en forma individual fueron: Del PACSR: Aminoácidos y LCR. Del LCR fueron: Mezcla de lípidos, todos lo que contiene el LCR, pero la mezcla hecha en el laboratorio y las lipoproteínas a una concentración de 240 $\mu\text{g/ml}$ (concentración a la cual se encuentra en el LCR). Algunos de estos grupos se probaron en combinación, tales grupos fueron: Aminoácidos más lipoproteínas; Aminoácidos más lípidos; Aminoácidos, más lípidos, más lipoproteínas; aminoácidos más LCR.

Los grupos de aminoácidos, lípidos y lípidos más aminoácidos resultaron en lisis dentro de las primeras 24 horas. El LCR mantuvo vivas a las amibas por el tiempo que duró el experimento, sin que se multiplicaran. Aminoácidos más LCR (PACSR) dio

rendimientos similares al PEHPS. Las mezclas de aminoácidos, más lípidos, más lipoproteínas, aminoácidos más lipoproteínas y únicamente las lipoproteínas dieron

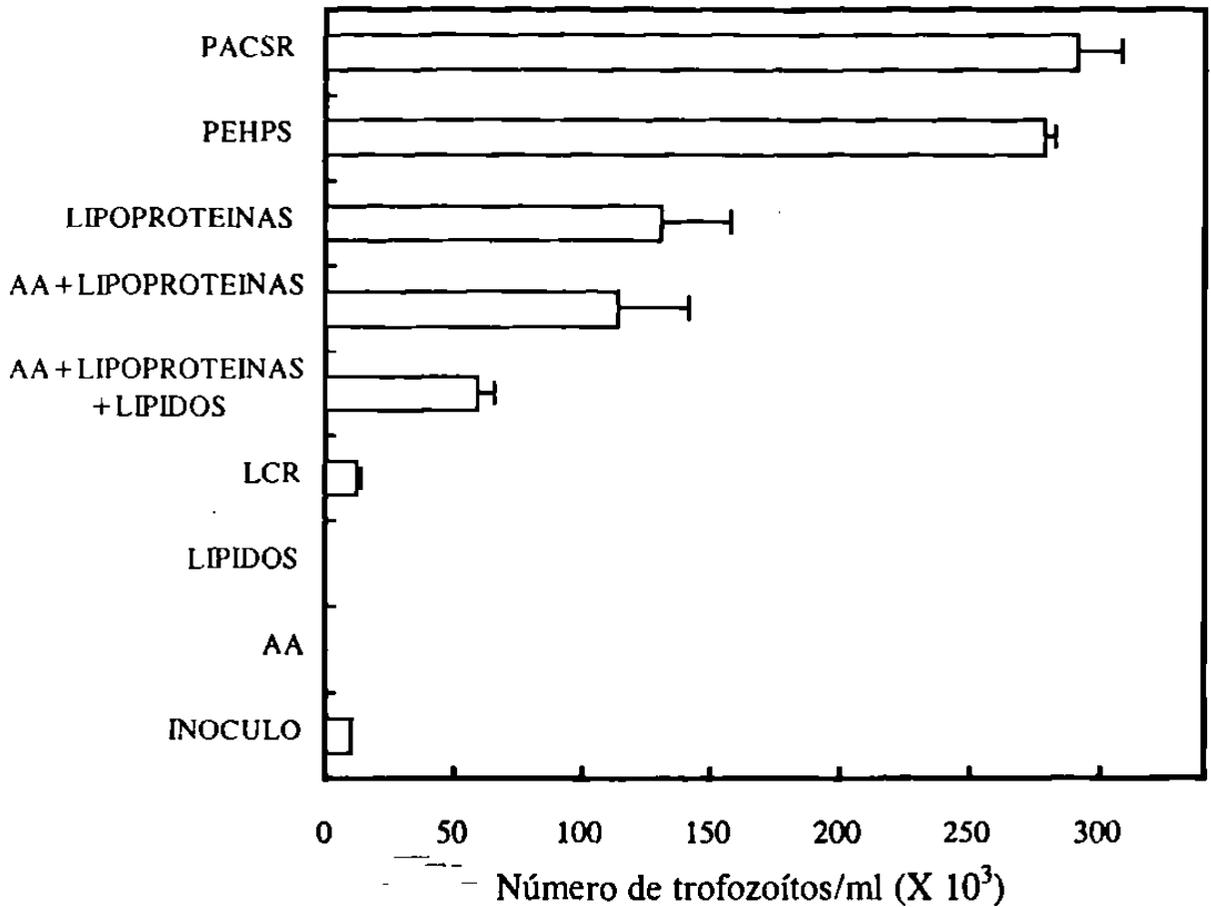


Figura 5. Efecto de los componentes del PACSR añadidos al PEHP sobre el crecimiento de la cepa HK9:NIH. En tubos de 13 X 100 mm, con 5 ml de medio PEHP adicionado con PACSR, suero o grupos de los componentes del PACSR mencionados en la gráfica. Los tubos se incubaron a 36.5 °C por 72 h y se contó el número de amibas/ml. Las cantidades usadas en cada combinación se mencionan en la sección de materiales. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar de 7 experimentos por triplicado.

rendimientos del 80, 65 y del 55 % menores al PACSR respectivamente. Lo que nos indica que si añadimos únicamente lipoproteínas al cultivo de *E. histolytica*, los cultivos pueden desarrollarse.

Optimación de la concentración de lipoproteínas para las distintas cepas de *E. histolytica*.

Para encontrar la dosis de lipoproteínas que soportaran el máximo crecimiento de las cepas HK9:NIH, HM1:IMSS y HM3:IMSS se probaron diferentes dosis de lipoproteínas en el medio basal de cultivo (PEHP).

Los rendimientos de la cepa HK9:NIH fueron similares a los testigos (PEHPS y PEHP-PACSR). Los rendimientos de los cultivos de la cepa HK9:NIH fueron dependientes de la dosis (entre 120 y 600 $\mu\text{g/ml}$). Con concentraciones de 120 hasta 360 $\mu\text{g/ml}$ de lipoproteínas produjeron rendimientos menores con respecto al testigo PACSR ($p < 0.005$), con 480 y 600 $\mu\text{g/ml}$ de lipoproteínas los rendimientos no fueron significativamente diferentes con respecto al testigo PACSR (Tabla 10). Con concentraciones mayores de 600 $\mu\text{g/ml}$ la cepa HK9:NIH mostró una disminución del rendimiento del 75 %.

El requerimiento de la cepa HM1:IMSS por lipoproteínas resultó ser diferente a la de HK9:NIH. La cepa HM1:IMSS también mostró una dependencia por la dosis de lipoproteínas, aunque menos acentuada que HK9:NIH. La dosis que mostró los mejores rendimientos fue la de 960 μg de lipoproteínas/ml. Dichos rendimientos fueron prácticamente iguales a los de los cultivos mantenidos en PACSR ($p < 0.2$). Sin embargo

los rendimientos obtenidos con 960 μg no fueron significativamente diferentes a los obtenidos con 480, 720 y 1200 μg de lipoproteínas/ml (Tabla 11).

La densidad de los cultivos de HM3:IMSS cultivada en diferentes concentraciones de lipoproteínas, fue similar a la densidad alcanzada por los cultivos testigos cultivados en presencia de PACSR. Cuando se probó la significancia entre las dosis encontramos que la dosis de 600 $\mu\text{g/ml}$ demostraba ser diferente ($p = 0.01$) (Tabla 12).

Con la cepa HM1:IMSS cultivada en TYI en presencia de lipoproteínas encontramos una dosis optima de 720 $\mu\text{g/ml}$ de lipoproteínas. Cuando comparamos los rendimientos obtenidos con 720 $\mu\text{g/ml}$ contra el testigo PACSR encontramos que son significativos ($p = 0.01$). Con el resto de la dosis probadas no encontramos ninguna significancia (Tabla 13).

Los rendimientos obtenidos con las cepas HK9:NIH y HM1:IMSS cultivadas en PEHPS no fueron diferentes cuando se compararon contra aquellos obtenidos con PACSR. Pero con la cepa HM3:IMSS cultivada en PEHPS y la cepa HM1:IMSS cultivada en TYI-S-33 las diferencias fueron altamente significativas ($p < 0.001$), debido a que las cepas eran de adaptación reciente al PACSR.

Tabla 10. Rendimientos de la cepa HK9:NIH cultivada en medio PEHP con concentraciones variables de lipoproteínas.

Suplemento añadido al medio basal PEHP	Concentración	Rendimiento ^b	
		absoluto	relativo
SUERO	8.00 %	438.89 ± 97.10	1.37
PACSR	8.00 %	320.10 ± 113.14	1.00
LIPOPROTEINAS	120 ^a	65.34 ± 20.55 ^c	0.20
	240 ^a	114.41 ± 42.12 ^c	0.35
	360 ^a	205.10 ± 76.37 ^c	0.64
	480 ^a	281.14 ± 108.77	0.87
	600 ^a	351.04 ± 147.31	1.10
	750 ^a	80.90 ± 29.00	0.25

^aConcentración de lipoproteínas en $\mu\text{g/ml}$.

^bTrofozoítos/ml $\times 10^3$, promedio \pm desviación estándar de 5 experimentos independientes por triplicado.

^c $p < 0.005$

**Tabla 11. Rendimientos de la cepa HM1:IMSS cultivada en medio PEHP
con concentraciones variables de lipoproteínas.**

Suplemento añadido al medio basal PEHP	Concentración	Rendimiento ^b	
		absoluto	relativo
SUERO	8.00 %	106.32 ± 21.63	1.10
PACSR	8.00 %	96.56 ± 0.80	1.00
LIPOPROTEINAS	240 ^a	60.72 ± 0.80 ^c	0.62
	480	89.53 ± 1.40	0.92
	720	79.65 ± 1.37	0.82
	960	95.83 ± 1.50	0.99
	1200	85.00 ± 1.52	0.88

^aConcentración de lipoproteínas en µg/ml.

^bTrofozoítos/ml x 10³, promedio ± desviación estándar de 5 experimentos independientes por triplicado.

^cp < 0.005

**Tabla 12. Rendimientos de cepa HM3:IMSS cultivada en medio PEHP
con concentraciones variables de lipoproteínas.**

Suplemento añadido al medio basal PEHP	Concentración	Rendimiento ^b	
		absoluto	relativo
SUERO	8.00 %	270.10 ± 50.67	2.80
PACSR	8.00 %	96.56 ± 38.95	1.00
LIPOPROTEINAS	240 ^a	88.62 ± 33.00	0.91
	360	116.45 ± 36.77	1.20
	480	97.01 ± 29.44	1.00
	600	123.63 ± 34.77	1.28
	1200	117.05 ± 19.73	1.21

^aConcentración de lipoproteínas en µg/ml.

^bTrofozoítos/ml x 10³, promedio ± desviación estándar de 5 experimentos independientes por triplicado.

^cp < 0.005

Tabla 13. Rendimientos de la cepa HM1:IMSS cultivada en medio TYI con concentraciones variables de lipoproteínas.

Suplemento añadido al medio basal TYI	Concentración	Rendimiento ^b	
		absoluto	relativo
SUERO	8.00 %	247.32 ± 26.75	3.08
PACSR	8.00 %	80.10 ± 37.64	1.00
LIPOPROTEINAS	240 ^a	58.12 ± 15.61	0.72
	480 ^a	60.12 ± 22.54	0.75
	720 ^a	116.60 ± 29.71 ^c	1.45
	960 ^a	99.16 ± 39.61	1.23
	1200 ^a	113.22 ± 46.89	1.41

^aConcentración de lipoproteínas en µg/ml.

^bTrofozoítos/ml x 10³, promedio ± desviación estándar de 5 experimentos independientes por triplicado.

^cp < 0.01

Caracterización de la actividad hemolítica de la P30 de los trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS crecidas en PEHPS, PEHP-PACSR y PEHP-LIPO.

La actividad hemolítica de la fracción P30 de los trofozoítos crecidos en presencia de suero fue lineal con respecto al tiempo de incubación. A los 60 minutos se alcanzó el 95 % de hemólisis (Figura 6).

Una vez conocido el tiempo de incubación, se determinó la dosis hemolítica media (DH_{50}) de P30 de amibas cultivadas en presencia de suero, PACSR o lipoproteínas en 60 min de incubación. En las figuras 7 a la 9 se observa que el porcentaje de hemólisis incrementó en función de la dosis de P30 de amibas cultivadas en presencia de PEHPS, PEHP-PACSR y PEHP-LIPO, respectivamente. La DH_{50} fue de 193 μg de proteínas para las amibas cultivadas en PEHPS, de 270 μg para las amibas cultivadas en PEHP-PACSR y de 310 μg para las amibas cultivadas en PEHP-LIPO (Figuras 7, 8 y 9).

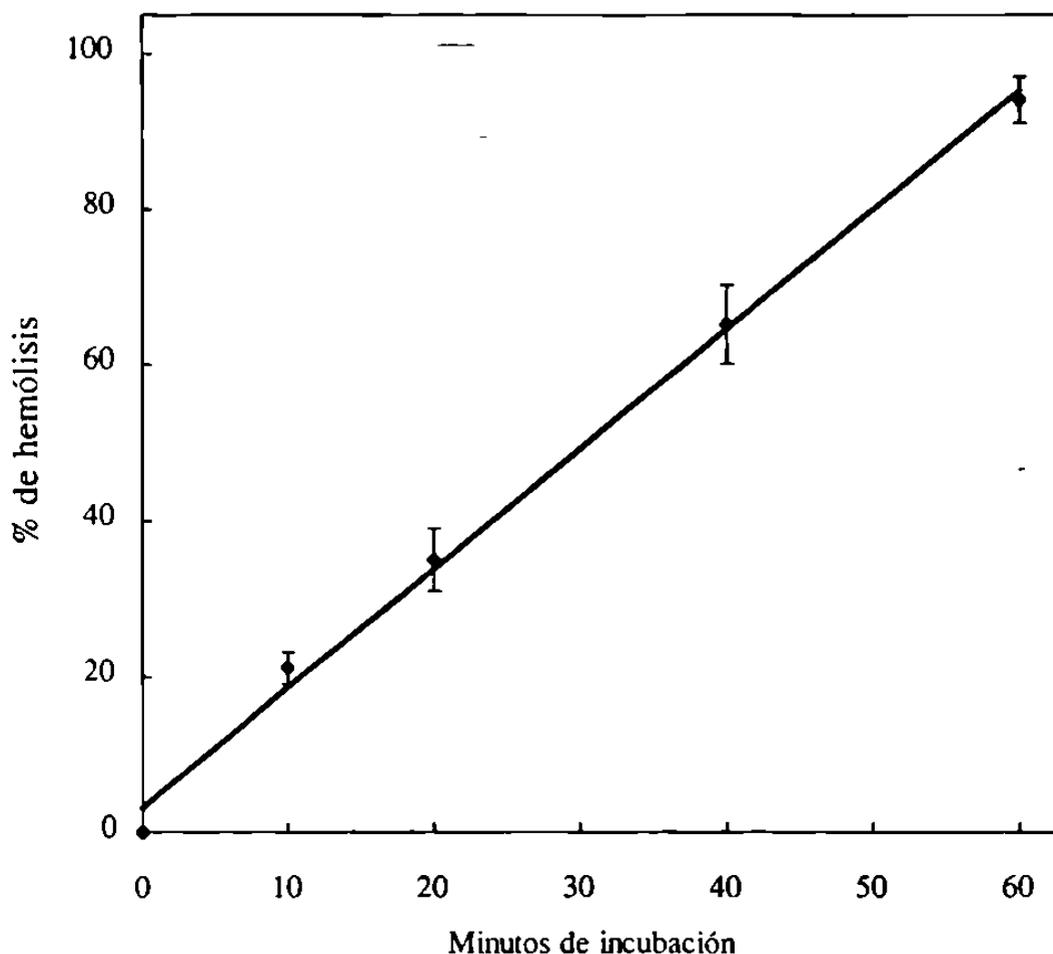


Figura 6. Relación temporal de hemólisis producida por la fracción P30 de trofozoítos cultivados en PEHPS. En tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad mezclamos 300 μ g de proteínas de P30 de trofozoítos cosechados en la fase exponencial de crecimiento, cultivadas en PEHPS, en 25 μ l de eritrocitos de rata al 3 %. Los puntos corresponden al promedio y desviación estándar de 9 determinaciones en tres experimentos independientes.

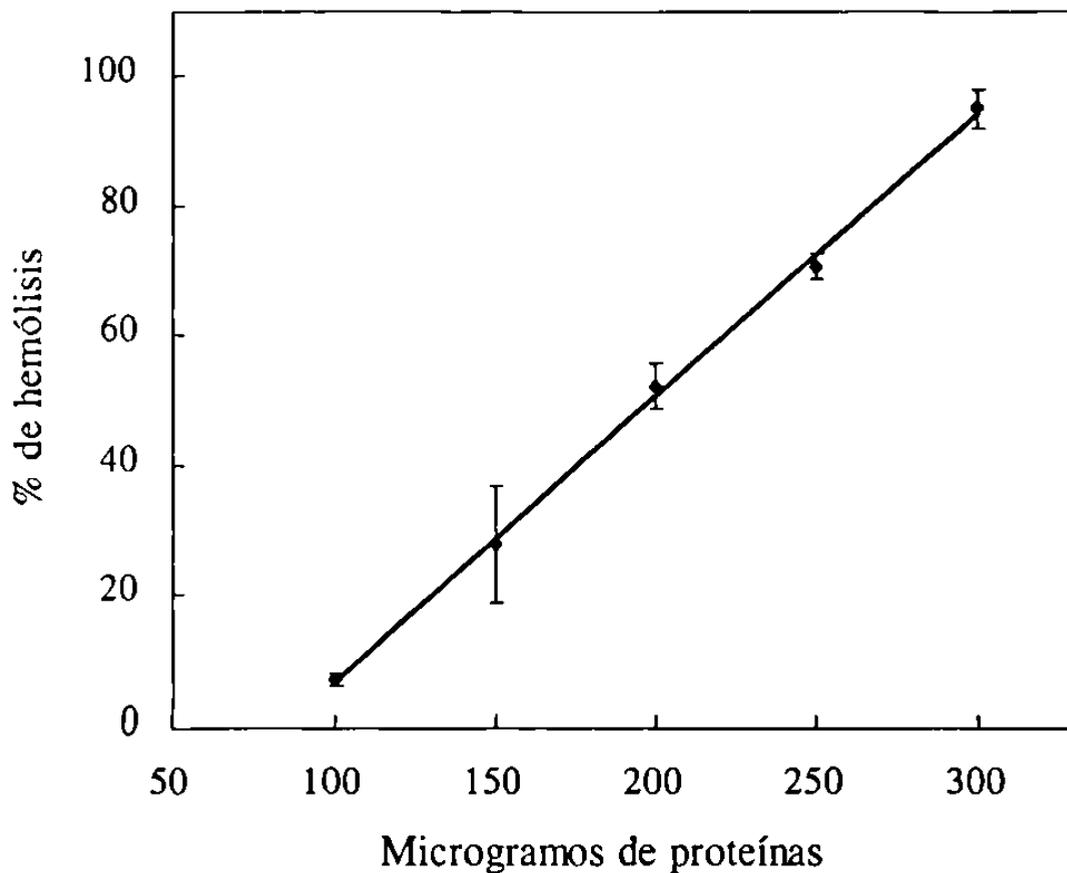


Figura 7. Curva dosis-respuesta de la fracción P30 de cepa HM1:IMSS crecida en PEHPS. Después de una hora de incubación a 37 °C, determinamos el porcentaje de hemólisis en mezclas de ensayo con 3 % de eritrocitos de rata y concentraciones variables de proteínas. Cada símbolo corresponde al promedio y desviación estándar de nueve determinaciones en tres experimentos independientes.

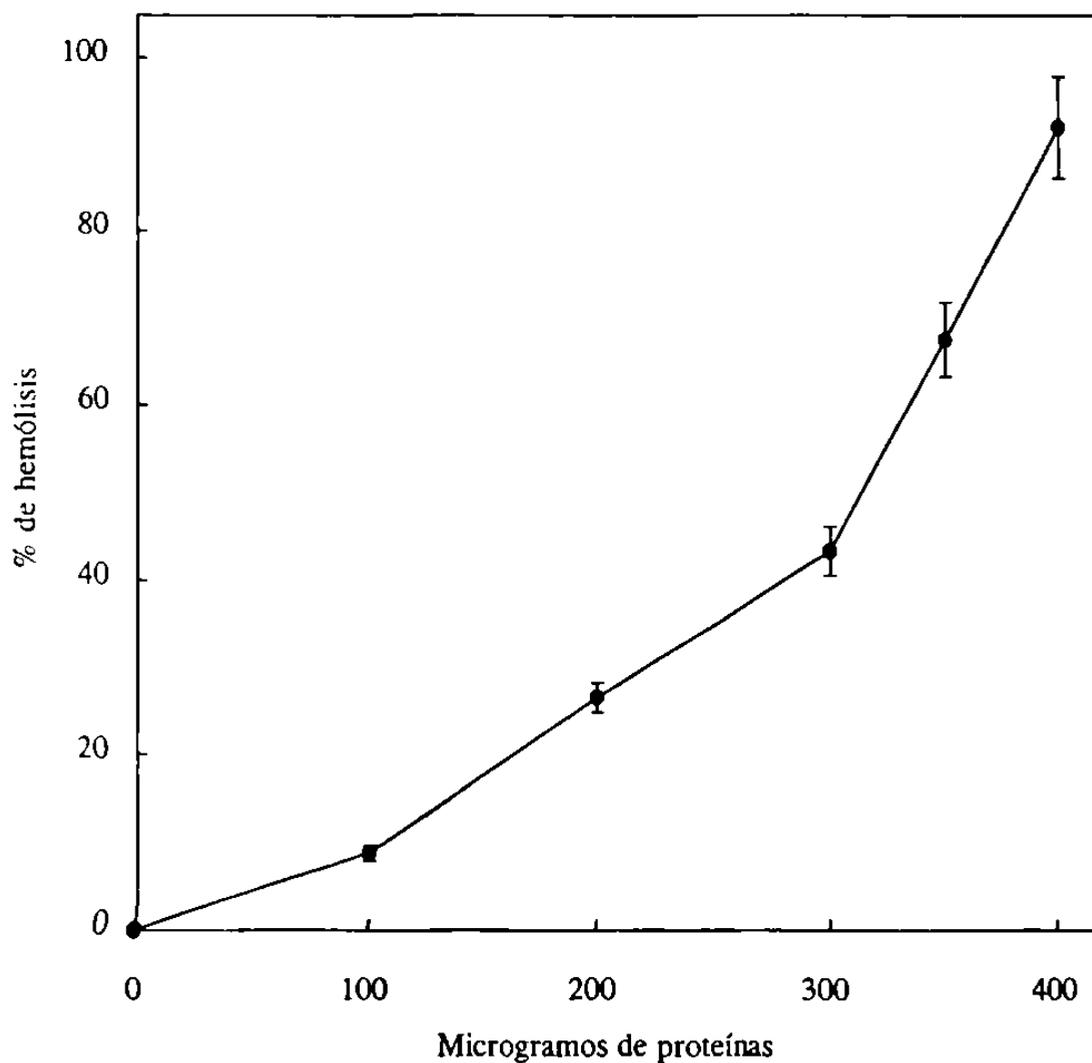


Figura 8. Curva dosis-respuesta de la fracción P30 de cepa HM1:IMSS crecida en PEHP-PACSR. Después de una hora de incubación a 37 °C, determinamos el porcentaje de hemólisis en mezclas de ensayo con 3 % de eritrocitos de rata y concentraciones variables de proteínas. Cada símbolo corresponde al promedio y desviación estándar de nueve determinaciones en tres experimentos independientes.

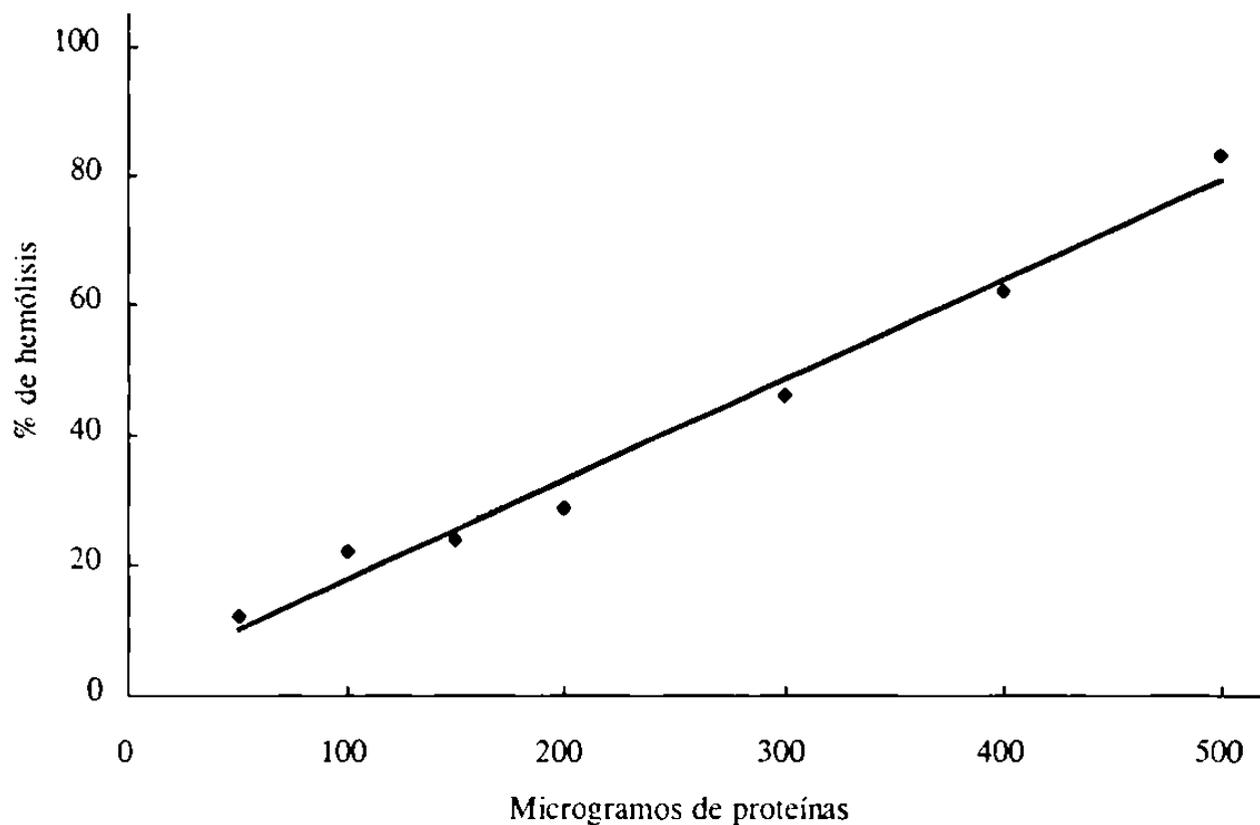


Figura 9. Curva dosis-respuesta de la fracción P30 de cepa HMI:IMSS crecida en PEHP-LIPO. Después de una hora de incubación a 37 °C, determinamos el porcentaje de hemólisis en mezclas de ensayo con 3 % de eritrocitos de rata y concentraciones variables de proteínas. Cada símbolo corresponde al promedio y desviación estándar de nueve determinaciones en tres experimentos independientes.

Capacidad de la cepa HM1:IMSS crecida en PEHPS, PEHP-PACSR y PEHP-LIPO para producir abscesos hepáticos en hámsters.

El aspecto de los abscesos hepáticos de los hámsters, causados por los trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS cultivados en PEHPS fueron de apariencia granulosa, y ocupan la mayor parte del lóbulo derecho, sitio donde se inoculó a los trofozoítos. El tamaño de los abscesos fue de 3 cm por 1.5 cm e invadió parte del lóbulo izquierdo (Figura 10).

Los trofozoítos cultivados en PEHPS, PEHP-PACSR y PEHP-LIPO fueron capaces de producir abscesos hepáticos en hámsters en un 80.0, 88.20 y 53.4 % respectivamente (Tabla 14). El análisis estadístico demostró diferencias significativas ($p > 0.05$) cuando se compararon los de PEHP-LIPO contra PEHPS y PEHP-PACSR pero estos últimos entre sí no fueron diferentes.

La forma, aspecto y tamaño de los abscesos inducidos con trofozoítos cultivados en PEHP-PACSR fue similar al de los trofozoítos cultivados en presencia de suero (Figura 11). En cambio, las amibas de esta misma cepa pero cultivadas en PEHP adicionado únicamente con lipoproteínas (PEHP-LIPO) produjeron abscesos localizados cerca de la zona del inóculo y su tamaño fue notablemente menor (70 %) que los abscesos producidos por amibas cultivadas en presencia de PACSR o suero bovino (Figura 12).

Tabla 14. Relación de animales que presentaron absceso hepático amibiano.

SUPLEMENTO	No. POSITIVOS/No. TOTAL	PORCENTAJE
SUERO	12/15	80.00
PACSR	15/17	88.20
LIPOPROTEINAS	7/13	53.84*

* $p > 0.05$.

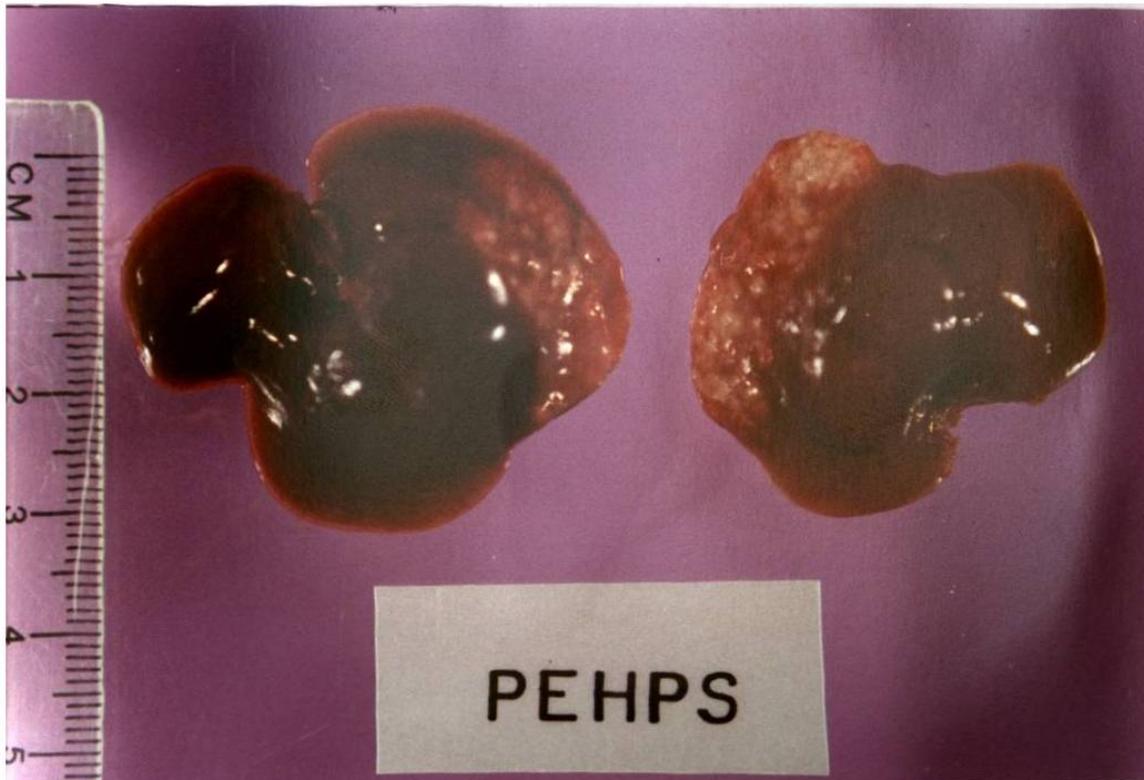


Figura 10. Producción de abscesos hepáticos en hámsters con trofozoítos cultivados en presencia de suero. Cosechamos los trofozoítos en fase exponencial de crecimiento. Ajustamos la concentración a 10^7 trofozoítos por ml de medio basal PEHP. Inoculamos 0.1 de esa suspensión se inoculó en el lóbulo derecho del hígado de cada hámster. Analizamos los resultados después de 7 días.

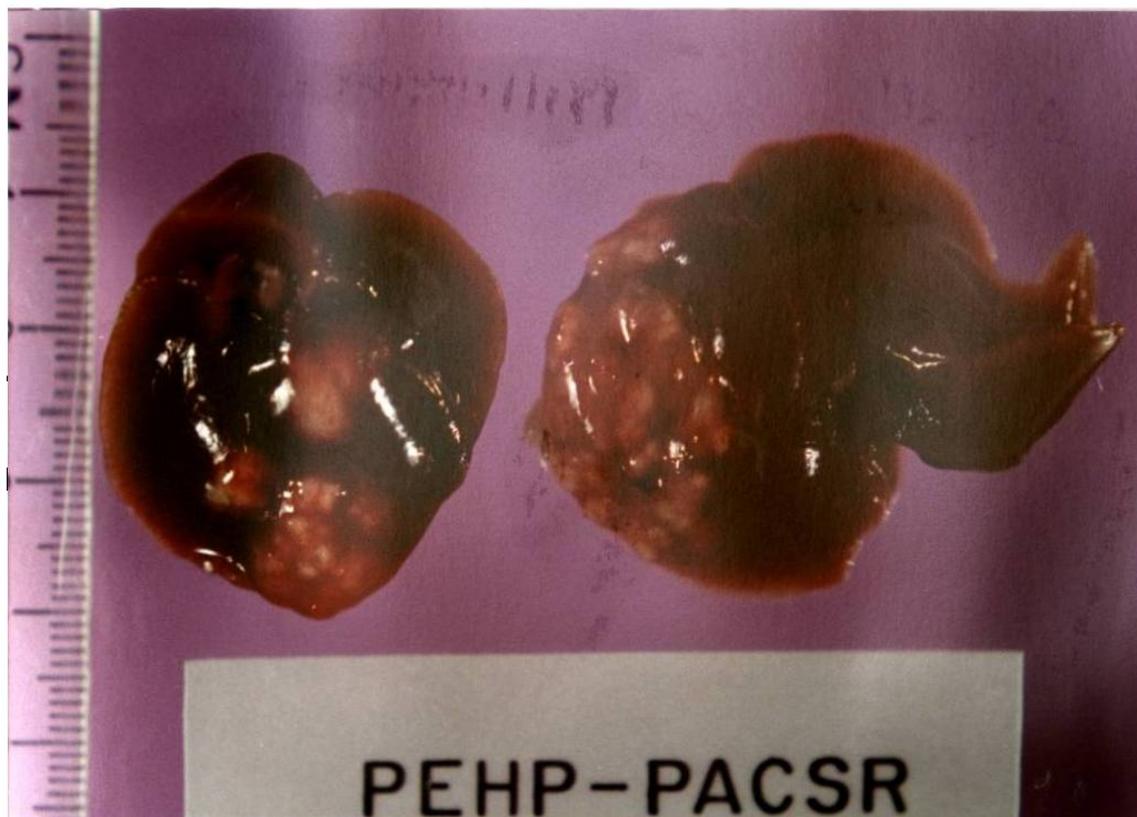


Figura 11. Producción de abscesos hepáticos en hámsters con trofozoítos cultivados en presencia de PACSR. Cosechamos los trofozoítos en fase exponencial de crecimiento. Ajustamos la concentración a 10^7 trofozoítos por ml de medio basal PEHP. Inoculamos 0.1 de esa suspensión se inoculó en el lóbulo derecho del hígado de cada hámster. Analizamos los resultados después de 7 días.

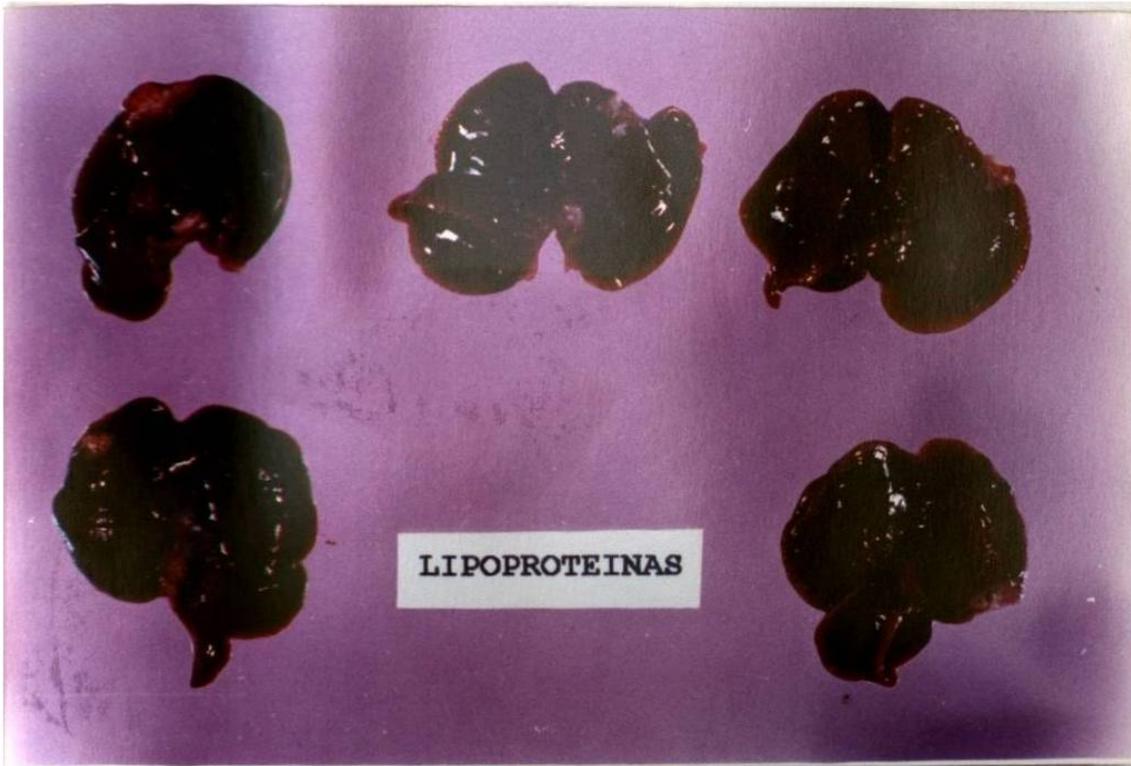


Figura 12. Producción de abscesos hepáticos en hámsters con trofozoítos cultivados en presencia de lipoproteínas. Cosechamos los trofozoítos en fase exponencial de crecimiento. Ajustamos la concentración a 10^7 trofozoítos por ml de medio basal PEHP. Inoculamos 0.1 de esa suspensión se inoculó en el lóbulo derecho del hígado de cada hámster. Analizamos los resultados después de 7 días.

DISCUSION

Para el cultivo axénico de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* se utiliza preferentemente el medio TYI-S-33 (Diamond y col, 1978). En nuestro laboratorio hemos trabajado por más de diez años con un medio desarrollado por nuestro grupo, el PEHPS (Saíd-Fernández y col, 1988), ambos contienen componentes indispensables para el crecimiento de las amibas. El PEHPS contiene un extracto de hígado y páncreas y el TYI-S-33 un extracto de levadura. Además, en ambos medios, se requiere la presencia de otro constituyente indispensable para el crecimiento amibiano en condiciones axénicas: el suero equino o bovino.

Algunas moléculas séricas pueden enmascarar los efectos *in vitro* de factores de virulencia; por ejemplo, la alfa-2-macroglobulina inhibe a las cisteín-proteasas amibianas (Lushbaugh y col, 1981, Pérez-Montfort y col, 1987), la albúmina sérica bovina inhibe la actividad hemolítica, (Saíd-Fernández y López-Revilla, 1988) y un factor no identificado en el suero inhibe la actividad de colagenasa de los trofozoítos (Muñoz y col, 1982)

En 1992 (Saíd-Fernández y Mata-Cárdenas, 1992), confirmamos la utilidad del PEHPS para el producir biomasa de trofozoítos de *E. histolytica*, en cultivos en suspensión utilizando volúmenes de medio de 2 l.

En 1995 (Mata-Cárdenas y Saíd-Fernández 1995), encontramos que los rendimientos en el crecimiento de *E. histolytica* se incrementaban 1.74 veces con respecto a los rendimientos alcanzados por la cepa HK9:NIH mantenida en PEHPS cuando se suplementaba el medio con 0.24 g/l de bilis. Lo que nos sugirió que las amibas

posiblemente requieren algunos lípidos para su crecimiento. Suponemos que en el PEHPS el suero era la principal fuente de lípidos.

Diversos autores han demostrado que algunos lípidos como: el colesterol (Griffin y McCarten 1949, y Latour y col, 1965) y el ácido oleico (Griffin y McCarten 1949) son esenciales para *E. histolytica*.

Sin embargo al inicio de este trabajo, supusimos que quizás algunos otros lípidos podrían ser esenciales para las amibas y que si suministráramos al medio basal PEHP los nutrientes adecuados, podríamos eliminar el suero como componente esencial y contar con un medio más sencillo que nos permitiese analizar la auxotrofia para fosfolípidos, algunos ácidos grasos y fosfolípidos. Por ello nos propusimos como primer objetivo, desarrollar un sustituto de suero, al cual llamamos sustituto de suero para el cultivo axénico de protozoarios (en inglés PACSR) (Patente en trámite, Mata-Cárdenas y col, 1996).

Para lograr el objetivo mencionado analizamos el crecimiento de las amibas en el medio PEHP (sin suero) adicionado con una mezcla comercial de lípidos comercial, LCR, (Lipid Cholesterol Rich) a una concentración de 10 ml/l (Tabla 5). Aunque las amibas no crecieron en estas condiciones, éstas se mantuvieron vivas y conservaron su capacidad para desarrollarse cuando eran pasadas a un medio suplementado con suero (Figura 2). Cuando al LCR se le añadió una proteína como la seroalbúmina bovina (SAB), las amibas crecieron vigorosamente dando rendimientos hasta 8 veces superiores a los obtenidos cuando son cultivadas únicamente en presencia de LCR. Cuando les añadimos a los cultivos amibianos una mezcla de LCR más SAB y vitaminas, los rendimientos fueron casi de dos veces superiores a los encontrados con LCR más SAB, lo que nos indicó, que las vitaminas son

necesarias para el crecimiento de las amibas en cultivo (Figura 2). Hasta entonces nosotros contábamos con un sustituto de suero (LCR más SAB más VIT) que soportaba un buen crecimiento amibiano, aunque 44 % menor que el alcanzado por los testigos cultivados en PEHPS (Fig. 3).

Por otro lado, se sabe desde hace mucho tiempo, que la seroalbúmina, es una proteína que puede acarrear hasta 6 moléculas de ácidos grasos (Starinski y Shafrir 1970, Goodman 1958, Spector 1969) y otros lípidos y moléculas de diversas índole. Este efecto de mejoramiento del rendimiento observado con SAB podría haberse debido a: (a) a la proteína misma, (b) a los ácidos grasos u otros componentes acarreados por la SAB o (c) a una combinación de ambos. Para discernir entre estas posibilidades, sustituimos al SAB por seroalbúmina libre de ácidos grasos (SAB-DL). Nuestros resultados parecían apoyar la posibilidad de que no eran las moléculas acarreadas por la SAB, las que requerían las amibas para su crecimiento, sino la SAB misma o los aminoácidos que la componen. Concluimos esto porque la SAB-DL a una concentración de 1.25 g/l apoyó el crecimiento amibiano con rendimientos equivalentes a los alcanzados por las amibas mantenidas en PEHP más 2.5 g de seroalbúmina no deslipidizada (Figura 4). Llama la atención que se requirió mayor cantidad de SAB no deslipidizada que de SAB-DL. Esto podría deberse a que la SAB no deslipidizada, contiene moléculas tóxicas para las amibas que inhiben parcialmente su crecimiento.

Los rendimientos de las amibas aumentaron dos veces cuando al medio que contenía LCR más SAB-DL y vitaminas, le añadimos una cantidad extra de glucosa de 3.2 g/l, por

lo cual estos resultados demostraron que para el crecimiento bajo estas condiciones las amibas requieren una fuente de energía y/o de carbono adicional (Tabla 5).

De acuerdo con lo anterior era necesario investigar si era la SAB como tal o los aminoácidos derivados de su hidrólisis los requeridos por las amibas. Al realizar los experimentos correspondientes encontramos que si sustituíamos la SAB por la mezcla de aminoácidos de Earle (Eagle, 1959), la densidad alcanzada por los cultivos amibianos en presencia de los aminoácidos contenidos en la mezcla de Earle (todos los aminoácidos esenciales y no esenciales para las células de mamíferos) (Tabla 2). Como el PEHP carece prácticamente de proteínas, concluimos que en el PEHPS la única fuente de aminoácidos es el suero bovino. Por lo tanto en el PEHP adicionado con SAB deslipidizada o no, la única fuente de aminoácidos es esta proteína y algunas lipoproteínas que contiene el LCR (ver Tabla 5). Por lo tanto, si las amibas requieren aminoácidos éstos deben ser esenciales para *E. histolytica*. Es decir, las amibas causantes de la amibiasis en el hombre son incapaces de sintetizar aminoácidos esenciales y no esenciales, o al menos algunos de ellos. En este trabajo no identificamos cuales de éstos aminoácidos son esenciales para las amibas.

Para fines prácticos encontramos que sustituyendo el SAB por la mezcla de aminoácidos de Earle, añadida a la mezcla de lípidos (LCR) más las vitaminas y 3.2 g/l de glucosa adicional en el medio PEHP las amibas eran capaces de crecer sana y vigorosamente. Entonces habíamos encontrado un sustituto de suero para el cultivo axénico de *E. histolytica* (Tabla 2). Llamamos a este sustituto PACSR, porque pensamos que siendo el PEHPS y el TYI-S-33 útiles, no solo para cultivar *E. histolytica* en condiciones axénicas, sino también otros protozoarios como *Trichomonas vaginalis*

(Castro-Garza y col., 1996), *Giardia lamblia* (Keister, 1983) y *E. invadens* (Saíd-Fernández y col, 1988; Diamond, 1978), entonces el PACSR podría servir también para sustituir el suero en los cultivos de estas especies (*T. vaginalis*, *G. lamblia* y *E. invadens*) lo cual confirmamos más tarde (Mata-Cárdenas y col, 1997; Mata-Cárdenas y col, 1998; objetivos independientes de los de ésta tesis).

Por otro lado y continuando con los objetivos de esta tesis, encontramos que los medios de cultivo PEHP o TYI-33 suplementados con PACSR fueron capaces de sostener el crecimiento de otra dos cepas de *E. histolytica* la cepa HM1:IMSS y la HM3:IMSS. Cuando las amibas fueron cambiadas de PEHPS o TYI-S-33 a PEHP-PACSR o TYI-PACSR respectivamente, los trofozoítos se adaptaron rápidamente. Dentro de las primeras cuatro resiembras las amibas presentaron una fase lag de 48 h. Después de esta fase de iniciación las amibas progresivamente aumentaron sus rendimientos. Estos fueron cerca del 50 % con respecto a sus respectivos controles, excepto la cepa HK9:NIH que demostró densidades similares a las del control (Tabla 7). Las densidades mejoraron para el resto de las cepas a medida que transcurría el tiempo.

Después de 16 meses de subcultivos la cepa HM1:IMSS en PEHP-PACSR alcanzó densidades similares al control. La cepa HM3:IMSS aumento sus rendimientos en un 100 % en PEHP-PACSR con respecto a las densidades alcanzadas en las primeras resiembras en el mismo medio (Tabla 8).

El PACSR combinado con el PEHP o TYI puede sustentar el crecimiento vigoroso de *E. histolytica*, en ausencia de suero o albúmina sérica por largo tiempo. Lo anterior

muestra que el PACSR puede utilizarse con un medio clásico, como lo es el TYI en vez de PEHP, y con varias cepas de *E. histolytica*. (Mata-Cárdenas y col., 1996).

Una vez cumplido el primer objetivo: desarrollar un medio libre de suero para el cultivo axénico de *E. histolytica*, abordamos el siguiente problema; investigar si el colesterol, los fosfolípidos o los ácidos grasos libres contenidos en el LCR (ver Tabla 5), por separado eran capaces de sostener el crecimiento de *E. histolytica*, lo anterior para investigar cuales de estos componentes son esenciales para *Entamoeba histolytica*. Entonces analizamos el efecto de estos lípidos en forma individual o en diferentes combinaciones sobre el crecimiento de la cepa HK9:NIH. Para diseñar estos experimentos utilizamos las mismas concentraciones de cada lípido que tiene el LCR (Tabla 5). Los resultados mostraron que ninguno de los lípidos probados en forma individual o en cualquier combinación eran capaces de sostener el crecimiento de las amibas (Tabla 3). En los experimentos anteriores, deliberadamente omitimos la inclusión de lipoproteínas, que también contiene el LCR (Ver tabla 5). Esto se debió a que las lipoproteínas están constituidas por colesterol, ésteres de colesterol, algunos fosfolípidos, ácidos grasos y por supuesto apolipoproteínas A-1, A-2, A-4, B-48, B-100, C y E. Es decir, estas partículas contienen todos los lípidos que queríamos analizar y además cuentan con proteínas que son esenciales para que las células de mamíferos internalicen estos lípidos y los metabolicen (Stryer, 1988). Entonces, dado que los lípidos no estructurados no fueron capaces de sostener el crecimiento de las amibas, y por otro lado, el único componente del LCR que no habíamos probado eran las lipoproteínas, en el siguiente experimento probamos el efecto de estas partículas sobre el crecimiento de los trofozoítos de la cepa HK9:NIH.

Las lipoproteínas son partículas constituidas por un núcleo de lípidos rodeados por una capa de lípidos polares y apoproteínas. Ellas son sintetizadas y secretadas por el hígado y los quilomicrones por el intestino. Las lipoproteínas tienen dos papeles principales: a) solubilizan en medios acuosos lípidos altamente hidrofóbicos y b) contienen proteínas altamente especializadas como las apolipoproteínas A-1, A-2, A-4, B-48, B-100, C y E, que participan en la transducción de señales que ponen en marcha mecanismos que regulan la internalización de los lípidos organizados en lipoproteínas (colesterol, fosfolípidos, ésteres de colesterol y ácidos grasos). Organizan y permiten el movimiento de lípidos fuera de células y entre los tejidos (Stryer, 1988).

Al probar las lipoproteínas como fuente de lípidos con la cepa HK9:NIH encontramos que las amibas sí fueron capaces de crecer, aunque con rendimientos menores que a los alcanzados por los cultivos mantenidos en PACSR y en PEHPS (Figura 5). Este hallazgo es el más importante de los que se hicieron en el presente estudio, porque sugiere muy fuertemente que las amibas son auxótrofas de colesterol, fosfolípidos, ésteres de colesterol y/o ácidos grasos, pero que estos lípidos deben estar estructurados como lipoproteínas. Es muy probable que en forma similar a la que sucede en mamíferos, las amibas no sean capaces de internalizar y/o metabolizar a los lípidos libres. En tal caso, quizás también requieran del concurso de las apolipoproteínas para completar el mecanismo del metabolismo de sus propios lípidos. Debido a la propia naturaleza de las lipoproteínas, en el presente trabajo solo podemos concluir que éstos y no los lípidos "no estructurados" son esenciales para *E. histolytica* pero no podemos identificar en ellas la auxotrofia por algún lípido. Como ya habíamos investigado que las lipoproteínas son los elementos del

LCR que realmente requieren las amibas; pero sus rendimientos eran considerados más bajos que el PACSR completo, decidimos investigar si las lipoproteínas más cada uno de los componentes del PACSR individualmente o en diferentes combinaciones eran capaces de apoyar el crecimiento de las amibas. Encontramos que la cepa HK9:NIH, HM1:IMSS y HM3:IMSS crecen en presencia de lipoproteínas solas, pero en contra de lo esperado sus rendimientos disminuyeron sensiblemente cuando agregamos aminoácidos, vitaminas o ambos al medio PEHP adicionado con 3.2 g/l de glucosa.

Los aminoácidos, vitaminas y lipoproteínas, y posiblemente lípidos no organizados actúan en forma interactiva en el metabolismo amibiano y debe encontrarse la concentración óptima de cada uno de ellos para promover rendimientos mayores. El método estadístico simplex ha probado, ser una poderosa herramienta para resolver este tipo de problemas. Por lo que en futuras investigaciones, lo aplicaremos para mejorar los rendimientos de los cultivos amibianos.

A diferencia de HM1:IMSS y HM3:IMSS que no crecieron en presencia de una concentración relativamente baja de lipoproteínas (120 y 240 $\mu\text{g/ml}$), (Tablas 11 y 12) respectivamente, la cepa HK9:NIH se desarrolló en presencia de baja concentración de lipoproteínas (120 $\mu\text{g/ml}$; Tabla 10), investigamos si la concentración que habíamos utilizado (240 $\mu\text{g/ml}$ según el fabricante) era la óptima, observamos que el crecimiento de esta cepa en presencia de lipoproteínas era dependiente de la dosis, esto es, a mayor dosis mayor crecimiento, así nosotros con la concentración que probamos (600 $\mu\text{g/ml}$) obtuvimos rendimientos tan altos como en PEHPS y PEHP-PACSR, concentraciones mayores de la óptima (750 $\mu\text{g/ml}$) resultaron en la disminución del rendimiento (Tabla 10).

Con la cepa HM1:IMSS observamos que la concentración óptima era de alrededor de 960 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 11).

Con la cepa HM3:IMSS la concentración óptima, fue de 600 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 12).

Es muy interesante que las cepas HK9:NIH y HM3:IMSS cultivadas con 600 $\mu\text{g/ml}$ de lipoproteínas alcanzaron rendimientos equivalentes a los observados con PACSR y la cepa HM1:IMSS, incluso superior al PACSR con 960 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 11). Sin embargo ninguna cepa alcanzó los rendimientos que produce el PEHPS lo que sugiere que el PEHPS tiene nutrientes que requieren las amibas.

Los rendimientos de la cepa HM1:IMSS cultivada en TYI en estas condiciones superaron un 40 % a los rendimientos alcanzados con PACSR lo que indica que también en TYI se puede sustituir el suero completo por lipoproteínas.

Después de esto, quisimos comparar si las amibas de *E. histolytica*, cultivadas en suero, en PEHP-PACSR o en PEHP-LIPO (360 $\mu\text{g/ml}$); seguían presentando actividades de virulencia. Para ello, determinamos la actividad hemolítica de la fracción P30 obtenidas de las amibas cultivadas en cada una de las condiciones mencionadas y además la capacidad de los trofozoítos para producir abscesos hepáticos en hámster.

Con respecto a la actividad hemolítica de P30 (López-Revilla y Saíd-Fernández , 1980) obtenida de amibas cultivadas en medios adicionados con lipoproteínas o PACSR encontramos que si tenían actividad hemolítica, lo que muestra que esta actividad no se pierde cuando se elimina el suero de los cultivos. La DH_{50} para trofozoítos cultivados en suero fue de 193 μg (Figura 7), para PACSR de 270 μg (Figura 8) y para los trofozoítos cultivados en presencia de lipoproteínas de 310 μg (Figura 9), es decir que se requieren

mayor concentración de proteína en PACSR y lipoproteínas para tener el mismo efecto hemolítico que con suero.

Uno de estos factores que está en vías de investigación en nuestro grupo, son la presencia de vitaminas, ya que éstas afectan la presencia de una enzima hidrolítica, como lo es la fosfolipasa A₂ (Comunicación personal del Dr. Vargas Villarreal).

Con respecto a la inducción de abscesos hepáticos pudimos observar que en proporción y tamaño de los abscesos causados por trofozoítos cultivados en presencia de suero y PACSR, no hubo diferencias. Las amibas cultivadas con lipoproteínas en vez de suero o PACSR si fueron capaces de producir abscesos hepáticos, pero su tamaño fue considerablemente menores que el de los producidos con trofozoítos cultivados en PEHPS o PEHP-PACSR (Figuras 10-12). Esto puede ser debido a que la virulencia sea inducida por un factor que se encuentra en el suero y PACSR, pero no en las lipoproteínas o que los trofozoítos deban someterse a reinoculaciones seriadas para inducir la síntesis de compuestos que no produjeron en la primera inoculación.

CONCLUSIONES

1. El LCR contiene lípidos que son esenciales para *Entamoeba histolytica*. La seroalbúmina bovina puede ser sustituida por la mezcla de aminoácidos de Earle.
2. Es posible sustituir al suero con una mezcla de lípidos (LCR), adicionado de la mezcla de aminoácidos de Earle y vitaminas, para el cultivo axénico en PEHP o TYI de varias cepas de *E. histolytica*. Este sustituto de suero se le denominó PACSR.
3. El colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos son incapaces de sostener la vida de las amibas por sí solos.
4. Los lípidos estructurados como lipoproteínas son capaces, no solo, de mantener vivas a las amibas en ausencia de suero, sino además sostienen su crecimiento.
5. Las diferentes cepas de *E. histolytica* utilizadas en este trabajo pueden crecer cuando se cultivan únicamente en PEHP en presencia de lipoproteínas. La concentración óptima para las cepas HK9:NIH, para HM1:IMSS fue de 960 $\mu\text{g/ml}$ y HM3:IMSS fue de 600 $\mu\text{g/ml}$.
6. La cepa HM1:IMSS es capaz de crecer en medio TYI, cuando se sustituye el suero por lipoproteínas. Alcanza rendimientos superiores al del PACSR cuando el TYI es adicionado con 720 μg de lipoproteínas/ml.
7. La cepa HM1:IMSS conserva su capacidad hemolítica cuando se le cultiva con lipoproteínas en vez de suero pero esta actividad es 60 % menor que la del testigo cultivado en PEHPS.
8. La dosis hemolítica media de la P30 de la cepa HM1: IMSS fue de 193 μg de proteína para PEHPS, de 270 μg para PEHP-PACSR y para PEHP-LIPO de 310 μg .

9. La cepa HM1:IMSS es capaz de producir abscesos hepáticos en hámsters, pero los producidos por trofozoítos cultivados en presencia de lipoproteínas estos son de un tamaño considerablemente menor que los producidos por amibas mantenidas en PACSR o suero.
10. El componente más importante del suero son las lipoproteínas, las cuales agregadas en proporciones adecuadas a PEHP o TYI son capaces de promover el crecimiento de trofozoítos de *E. histolytica* en condiciones axénicas.
11. Las amibas cultivadas en PEHP o TYI adicionado con lipoproteínas conservan su virulencia, aunque ésta disminuye sensiblemente.

PERSPECTIVAS

Como objetivos siguientes en el medio libre de suero y adicionado con lipoproteínas, probaremos el efecto de las vitaminas-Tween 80 de Diamond, sobre algunas actividades biológicas que se han propuestos como factores de virulencia, tales como: la actividad hemolítica, la actividad proteolítica y actividad de fosfolipasa A₂. Si alguna de estas actividades fuese incrementada con las vitaminas, discerniremos que parte de estas, son las que producen este efecto.

Determinaremos si los trofozoítos de *E. histolytica*, pueden secretar al medio de cultivo en el medio PEHPS-PACSR y PEHP-LIPO, algunas proteínas con actividades biológicas, que pueden estar involucradas en la virulencia de este protozoario parásito.

Determinaremos también, si otras especies de protozoarios que tenemos en nuestro laboratorio como: *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia* pueden crecer en presencia de los medios PEHP-PACSR y PEHP-LIPO.

REFERENCIAS

- Alagón A, Cortés A, Olvera F, Olvera A, González A y Lizardi P (1996). Diseño y construcción de vectores para la transformación estable de *Entamoeba histolytica*. *Gac Méd Méx* 132: 476-482.
- Arroyo-Begovich A, Carabez-Trejo A y Ruiz-Herrera J. Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *J Parasitol* 66: 735-741.
- Boeck WC y Drbohlav J (1925). The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Am J Hyg* 5: 371-407.
- Bos HJ y Van de Griend (1977). Virulence and toxicity of axenic *Entamoeba histolytica*. *Nature* 265: 341-343.
- Bos HJ (1979). *Entamoeba histolytica*: Cytopathogenicity of intact amebae and cell-free extracts; isolation and characterization of an intracellular toxin. *Exp Parasitol* 47: 369-377.
- Castro-Garza J, Anaya-Velazquez F, Saíd-Fernández S, y Gonzalez-Garza MT (1996). Comparable growth of a *Trichomonas vaginalis* strain in PEHPS and TYI-S-33 media. *Arch Med Res* 27: 567-569.

Chou YL (1977). Análisis Estadístico. Nueva Editorial Interamericana, México. 112-151; 204-207.

Cleveland LR y Sanders EP (1930). The production of bacteria-free amoebic abscess in the liver of cats and observations on the amoebae in various media with and without bacteria. *Science* 72: 149-151.

Diamond LS (1961). Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science* 134: 336-337.

Diamond LS (1968). Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae. *J Parasitol* 54: 1047-1056.

Diamond LS, Harlow D y Cunnick CC (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72: 431-432.

Diamond LS (1983). Lumen dwelling protozoa: *Entamoeba*, *Trichomonads*, and *Giardia*. In Jensen JB (Ed). *In vitro* cultivation of protozoan parasites. CRC Press, Boca Raton, Florida, 65-109.

Ding JEY y Zanvil AC (1985). Molecular mechanisms of cytotoxicity mediated by *Entamoeba histolytica*: Characterization of a pore-forming protein (PFP). *J Cell Biochem* 29: 299-308.

Dobell C (1928). Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I. General introduction. II. Description of the whole life-history of *Entamoeba histolytica* in cultures. *Parasitol* 20: 357-412.

Dutta GP y Yadava JNS (1976). Interrelationship of pH and oxidation-reduction potential on growth of axenic *Entamoeba histolytica* and the influence of pH on amoebicidal activity of drugs. *Indian J Med Res* 64: 224-228.

Eagle H (1959). Aminoacid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130: 432-437.

Eldson-Dew R (1968). The epidemiology of amoebiasis. *Adv Parasitol* 6: 1-62.

Freshney, RI (1987). Culture of animal cells. A manual of basic techniques. pp. 57-85. John Wiley & Sons, New York.

Gillin FD y Diamond LS (1981). *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: Growth responses to reducing agents. *Exp Parasitol* 51: 382-391.

Gillin FD y Diamond LS (1981b). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*: Effects of temperature and oxygen tension on growth and survival. *Exp Parasitol* 49: 328-338.

González-Garza MT, Castro-Garza J, Anaya-Velazquez F, Mata-Cárdenas BD, Lozano-Garza G, Carranza-Rosales MP, Vargas-Villarreal J, y Saíd-Fernández S (1996). Anti-amoebic effect of gossypol in golden hamsters with experimental hepatic amoebic abscess. *Pharma Sciences* 2: 153-156.

Goodman DWS (1958). Interaction of human serum albumin with long-chain fatty acid anions. *J Am Chem Soc* 80: 3892-2898.

Griffin AM y McCarten WG (1949). Sterols and fatty acids in the nutrition of entozoic amoebae in cultures. *Proc Soc Exp Biol Med* 72: 645-648.

Gutiérrez G y Muñoz O (1994). Epidemiología de la amibiasis. Ed. Kretschmer R. Amibiasis. Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas, México, 207-225

Jacobs L (1947). The elimination of viable bacteria from cultures of *Entamoeba histolytica* and the subsequent maintenance of such cultures. *Am J Hyg* 46: 172-176.

Katiyar SK, Prasad AK, Ghoshal S, Das SR y Sagar P (1987). Cholesterol induced changes in glucose-6-phosphate generating enzymes, concanavalin A agglutinability and haemolytic activity of axenic *Entamoeba histolytica*. *Ann Trop Med Parasitol* 81: 201-205.

Katiyar SK, Ghoshal S, Gupta AK, Das SR, Pandey VC y Sagar P (1988). Action of cholesterol on virulence related biochemical functions of *Entamoeba histolytica*. *Indian J Exp Biol* 26: 848-850.

Keister BD (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 487-488.

Kobiler D, Mirelman D y Mattern CFT (1981). Lectin and toxin -like activities of *Entamoeba histolytica*: comparison of properties. *Am J Trop Med Hyg* 30: 955-959.

Kretschmer RR. Amibiasis. Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas, México.

Latour NG, Reeves RE & Guidry MA (1965). Steroid requirement of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* 16: 18-22.

Long-Kurg SA, Fisher JK, Hygmith MR y Ravdin JJ (1985). Phospholipase A₂ enzymes of *Entamoeba histolytica*: Description and subcellular localization. *J Infect Dis* 152: 542-549.

López-Revilla R y Saíd-Fernández S (1980). Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica* hemolytic activity of trophozoites homogenates. *Am J Trop Med Hyg* 29: 209-212.

Lowry OH, Rosebrough NS, Farr AL y Randall JR (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **183**: 265-275.

Lushbaugh W, Kairalla AB, Hofbauer AF, Arnaud P, Cantey JR y Pittman FE (1981). Inhibition of *Entamoeba histolytica* cytotoxin by alpha 1 antiprotease and alpha 2 macroglobulins. *Am J Trop Med Hyg* **30**: 575-585.

Lynch EC, Rosenberg IM y Gitler C (1982). An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *EMBO J* **1**: 801-804.

Martínez-Palomo A (1993). Parasitic amebas of the intestinal tract. In Krier JP y Baker JR (Ed.) *Parasitic Protozoa*. Academic Press. New York, **3**: 65-141.

Mata-Cárdenas BD y Saíd-Fernández S (1986). Wall synthesis in axenic cultures in axenic cultures of *Entamoeba histolytica* grown in PEHPS medium. *Arch Invest Méd* **17**: 25-30.

Mata-Cárdenas BD y Saíd-Fernández S (1990). Development of a simplified medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Méd* **21**: 247-251.

Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villarreal J Martínez-Rodríguez HG. y Saíd-Fernández S (1995). *Entamoeba histolytica* axenic growth improvement by ox bile. *Arch Invest Méd* **26**: 441-444

Mata-Cárdenas BD, Morales-Vallarta M, Vargas-Villarreal J y Saíd-Fernández S (1996). PACSR: a serum replacement for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 586.

Mata-Cárdenas BD, Navarro-Marmolejo L, Vargas-Villarreal J y Saíd-Fernández S (1998). Axenic cultivation of *Trichomonas vaginalis* in a serum-free medium. *J Parasitol En prensa* .

McCaul TF (1977). Transmission electron microscopy observation of phagocytosis in trophozoite of *Entamoeba histolytica* in contact with tissue culture cells. *Z Parasitenkd* 52: 203-211.

McConnachie, E.W. (1955). Studies on *Entamoeba invadens* Rodhain, 1934, *in vitro* and its relationship to some other species of *Entamoeba*. *Parasitology* 45: 452-431.

Meerovitch E y Ghadirian E (1978). Restoration of virulence of axenically cultivated *Entamoeba histolytica* by cholesterol. *Can J Microbiol* 24: 63-65.

Muñoz ML, Calderón J y Rojkind M (1982). The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 155: 42-51.

Ockner RK, Weisiger RA y Gollan JL (1983). Hepatic uptake of albumin-bound substances: albumin receptor concept. *Gastrointest Liver Physiol* 8: G13-G18.

Orozco E, Guarneros G, Martínez-Palomo A y Sanchez T (1983). *Entamoeba histolytica*: phagocytosis as a virulence factors. *J Exp Med* 158: 1511-1521.

Pérez-Montfort R, Ostoa-Saloma P, Velázquez-Medina L, y Becker I (1987). Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 26: 87-98.

Phillips BP (1950). Cultivation of *Entamoeba histolytica* with *Trypanosoma cruzi*. *Science* 111: 8.

Rai GP, Das SR, Mitra SC y Shipstone (1985). Scanning and transmission electron microscopic studies on cholesterol passaged axenic *Entamoeba histolytica*. *Indian J Exp Biol* 23: 103-106.

Ravdin JI y Guerrant RL (1982). A review of the parasite cellular mechanism involved in the pathogenesis of amebiasis. *Rev Infect Dis* 4: 1185-1207.

Rees CW, Reardon LV, Jacobs L y Jones F (1941). Problems encountered in the growth of *Entamoeba histolytica* cultures developed by microisolation. *Am J Trop Med* 21: 567-578.

Reeves RE y West B (1980). *Entamoeba histolytica*: Nucleic acid precursors affecting axenic growth. *Exp Parasitol* 49: 78-82.

Saíd-Fernández S y Vargas-Villarreal J (1986). Mecanismo multifactorial de la actividad citolítica de *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med* 17: 173-178.

Saíd-Fernández S y López-Revilla R (1988). Free fatty acids released from phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Immun* 56: 874-879.

Saíd-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G y Martínez-Rodríguez H (1988). PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 249-253.

Spector AA, John AK y Fletcher JE (1969). Binding of long chain fatty acids to serum albumin. *J Lipid Res* 10: 56-57.

Starinski R y Shafrir J (1970). Displacement of albumin-bound bilirubin by free fatty acids. Implications for neonatal bilirubinemia. *Clin Chim Acta* 29: 311-318.

Stryer L (1988). *Biochemistry*. Third edition. W. H. Freeman Co. New York. 560-564.

Van-Vliet HHDM, Op-Den-Kamp JAF y Van-Deenen LLM (1975). Lipid auxotrophy and the effect on lipid composition of *Entamoeba invadens*. *J Protozool* **22**: 428-432.

Van Vliet HHDM, Op Den Kamp JAF y Van Deenen LLM (1975b). Phospholipids of *Entamoeba invadens*. *Arch Biochem Biophys* **171**: 55-64.

Vargas-Villarreal J y Saíd-Fernández S (1984). *Entamoeba histolytica*: cytolytic activity of cell-free trophozoites extract upon cells. *Arch Invest Med*. **15**: 1-12.

Vargas-Villarreal J, Martínez-Rodríguez H, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT y Saíd-Fernández S (1995). Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and lysophospholipase L₁ activities. *Parasitol Res* **81**: 320-323.

Weik RR y Reeves RE (1980). Niacin requirement for growth of axenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* **29**: 1201-1204.

Wittner M (1968). Growth characteristics of axenic strains of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. *J Protozool* **15**: 403-406.

