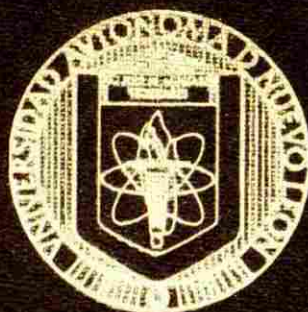


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EFFECTO DE FACTORES QUÍMICOS Y FÍSICOQUÍMICOS SOBRE LA CALIDAD
BIOLÓGICA DE QUISTES DE *Entamoeba histolytica* FORMADOS EN
CONDICIONES AXENICAS

POR

M.C.P. FRANCISCO GONZALEZ SALAZAR

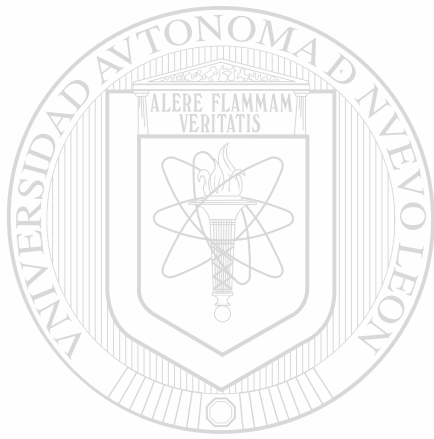
Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
con Especialidad en MICROBIOLOGIA

Septiembre 1998

UNIVERSITY OF MICHIGAN LIBRARY

TM
RC121
.A5
G6
c.1

UNIVERSITY OF MICHIGAN LIBRARY



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



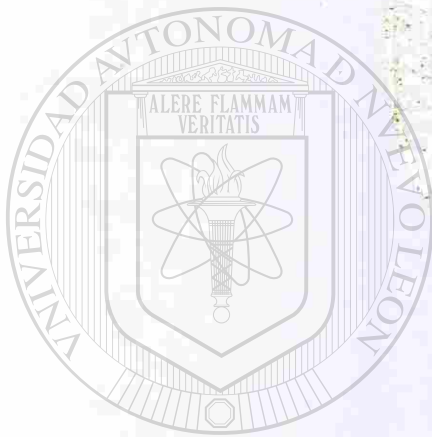
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

9452

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
ESTUDIO DE FACTORES QUÍMICOS Y FÍSICO-QUÍMICOS SOBRE LA CALIDAD
BIOLÓGICA DE QUISTES DE *Entamoeba histolytica* FORMADOS EN DIRECCIÓN
CONDICIONES AXÉNICAS

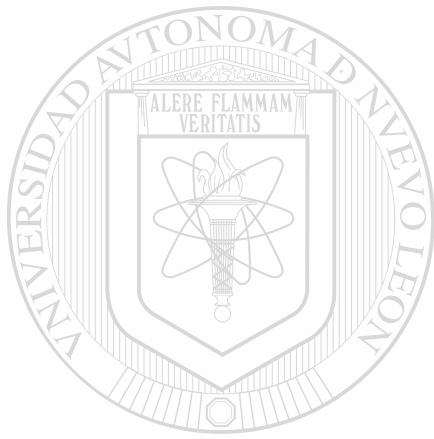
POR

M.C.P. FRANCISCO GONZÁLEZ SALAZAR

como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS con
Especialidad en MICROBIOLOGÍA.

Septiembre 1993

FM
RC121
FAS
176



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



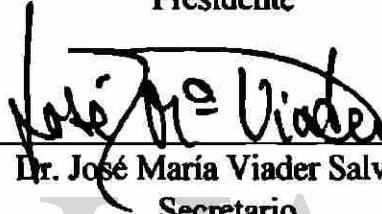
TITULO DEL PROYECTO:

EFFECTO DE FACTORES QUÍMICOS Y FISICOQUÍMICOS SOBRE LA CALIDAD BIOLÓGICA DE QUISTES DE *Entamoeba histolytica* FORMADOS EN CONDICIONES AXENICAS

Aprobación por comité de tesis.



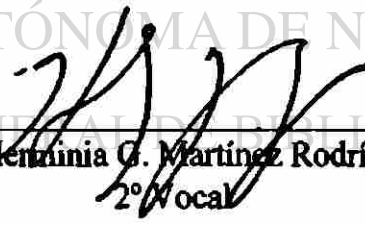
Dr. Salvador Said Fernández
Presidente



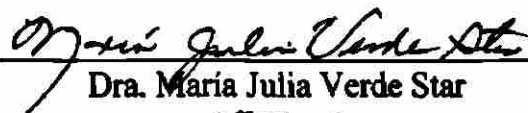
Dr. José María Viader Salvadó
Secretario



Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta
1^{er} Vocal



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
2^o Vocal



Dra. María Julia Verde Star
3^{er} Vocal

El presente trabajo se realizó en:

División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste: IMSS.

Departamento de Bioquímica, ULIEG, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Departamento de Patología, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.

División de Biología del Desarrollo, Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente: IMSS.

Director de tesis:

Dr. Salvador Said Fernández

Asesores:

Dr. José María Viader Salvadó

Departamento de Bioquímica, ULIEG, Facultad de Medicina, UANL.

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez

Departamento de Bioquímica, ULIEG, Facultad de Medicina, UANL

Dr. Mario R. Morales Vallarta

Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL

M.C. Eduardo Campos Góngora

División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste: IMSS.

Colaboradores:

Dr. Benito Mata Cárdenas

División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste: IMSS.

M.C. Juan Mora Galindo

División de Biología del Desarrollo, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Centro Médico de Occidente. IMSS, Guadalajara, Jal.

M.C. Enrique Ramírez Bon

Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UANL.

AGRADECIMIENTOS

Al iniciar esta nueva etapa de mi vida en la que siempre quise desarrollarme pero no había tenido la oportunidad de incursionar, quiero agradecer en un principio al Dr. Ramón Paniagua Sierra quien me invitó y orientó para realizar los trámites correspondientes para tramitar mi beca ante las autoridades del Instituto Mexicano del Seguro Social, así mismo a esta institución por las facilidades otorgadas a un servidor para el desarrollo de mi tesis.

Además de la admiración y respeto que me representa quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Salvador Said Fernández quien tuvo a bien aceptarme como discípulo y con su ejemplo, experiencia, honestidad y dedicación me han mostrado el camino que debe seguir un investigador, además quiero reconocer que con su amistad, comprensión y disposición elevan su gran sentido humano y sensible lo que favoreció en gran medida que el camino fuera más fácil de recorrer, en fin podría mencionar algunas otras de sus cualidades pero me concretaré a decirle ¡Gracias!

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Del mismo modo agradezco al Dr. José María Viader Salvadó, la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez, el Dr. Mario R. Morales Vallarta y la Dra. María Julia Verde Star, quienes me brindaron todo su apoyo compartiendo conmigo toda su experiencia y quienes con sus sugerencias ayudaron en gran medida a incrementar la calidad del trabajo realizado, así como a facilitar el desarrollo de la tesis, cabe mencionar que todos ellos me dieron además de su apoyo su amistad, lo cual agradezco de sobremanera.

Mención especial me merece el compañero, amigo y asesor M.C. Eduardo Campos Góngora, quien prácticamente me inició y me guió desde el diseño del proyecto, el desarrollo de mi trabajo y la escritura de la Tesis, mostrándome con su ejemplo la importancia de la disciplina y la dedicación en la calidad de la investigación, además en las sesiones filosóficas me enseñó el sentido de la responsabilidad, el valor cívico y la importancia de defender cada quien sus propias convicciones. Aprovecho para agradecer su hospitalidad y la de su esposa Vera cuando tuvimos la oportunidad de visitarlos.

A mis compañeros becados: Ricardo Zavala y su esposa Yolanda, Silvia González, Isaías Balderas, Teresa Valdéz, Rebeca Palacios, Irma, Tomás Castillo, José Catarino, Juan Angel Segura, Martha, Sigifredo y Elisa, por su gran sentido de solidaridad y compañerismo y con muchos de los cuales compartí una buena amistad.

A mis compañeros de laboratorio Benito Mata, Javier Vargas, Leticia Navarro y Manuel Rodríguez. Quienes me mostraron una gran paciencia, tolerancia, cooperación y, solidaridad, además compartieron conmigo toda su experiencia y me brindaron incondicionalmente su amistad ¡Gracias!

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias Biológicas, con quienes compartí momentos agradables y desafortunados, vivencias y momentos que guardo para siempre en mi mente y mi corazón.

A todo el personal de la división de Biología Celular y Molecular y muy en especial a la Dra. Ma Teresa González Garza y Barrón por todas las facilidades que se me otorgaron para el desarrollo de mi trabajo.

Al Dr. Benito Mata Cárdenas, compañero de trabajo y colaborador de este trabajo quien compartió conmigo su experiencia en el cultivo de protozoarios y en el diseño de medios de cultivo con el sustituto de suero para el cultivo axénico de protozoarios (PACSR).

Al M.C.P. Juan Mora Galindo y la División de Biología del Desarrollo del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, IMSS, por su ayuda en el análisis de microscopía electrónica.

Al M.C.P. Enrique Ramírez Bon, por su valiosa colaboración en el análisis de microscopía electrónica.

A todo el personal de la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la UANL. Que acertadamente dirige la Dra. María Julia Verde Star, quienes me facilitaron todos los trámites administrativos necesarios para el desarrollo de mi tesis.

A todo el personal del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada a un servidor para apoyar mis estudios de postgrado.

Al personal de la biblioteca del CIBIN por las facilidades otorgadas a un servidor para la obtención de material bibliográfico.

Al médico Antonio Luna De la Rosa y al señor Francisco Treviño por el apoyo con el arte gráfico necesario para el desarrollo de mi trabajo.

En general a todas las personas que de una u otra forma colaboraron conmigo y me ayudaron a realizar mi trabajo ¡Gracias! A todos los que criticaron mi persona y mi trabajo pues con sus críticas me ayudaron a superar los errores de metodología y de interpretación de resultados ayudándome a mejorar la calidad y buscar siempre la excelencia en mi trabajo. A todos ellos. ¡Muchas, pero muchas gracias!

A mi esposa e hijos quienes con su afecto me impulsan siempre a seguir adelante con mis proyectos y metas.

A ti que estás leyendo estas líneas ¡Gracias por tu atención e interés!. Espero que esta lectura te sea de provecho.

¡Gracias a DIOS! por darme la oportunidad de buscar el conocimiento rodeado de excelentes personas como ustedes...

DEDICATORIA

Deseo dedicar este trabajo a una gran persona que a pesar de sus limitaciones, se engrandecía mostrando siempre su disposición por ayudar, siempre optimista, siempre fuerte, siempre con una sonrisa y con una palabra de aliento, con un gran amor a la vida, a su familia, a DIOS. Francisco, decía, no podemos quedarnos a ver como las demás personas realizan sus sueños, nosotros podemos alcanzar los nuestros solo hay que desearlos de corazón...

AL

Médico, Pediatra Rafael Villarreal Velázquez †

Quien durante toda su vida y hasta la muerte fue un ejemplo de coraje y gran corazón.

A mis padres :

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Sr. Francisco González González

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

y

Sra. María Andrea Salazar de González †

Les dedico siempre todo lo que hago en mi vida...

Espero ser motivo de orgullo para ellos, es lo menos que se merecen.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo

Página

1 Introducción

1.1	Amibiasis.....	1
1.2	Taxonomía.....	2
1.3	Ciclo Biológico de <i>E. histolytica</i>	2
1.4	Estructura de la pared quística.....	3
1.5	El enquistamiento.....	5
1.6	Factores que inducen el enquistamiento.....	7
1.7	El Método Simplex.....	9
1.8	Hipótesis.....	9
1.9	Objetivos.....	9
	1.9.1 Objetivo General.....	9
	1.9.2 Objetivos específicos.....	9

2 MATERIALES

2.1	Origen de los reactivos.....	11
2.2	Material Biológico.....	12
	2.2.1 Amibas.....	12
2.3	Preparación de los medios de cultivo.....	12
	2.3.1 Extracto de Hígado y Páncreas (EHP).....	12
	2.3.2 Preparación del medio PEHPS.....	13
	2.3.3 Preparación y adición de suero bovino.....	13
	2.3.4. Medio Basal Para Enquistamiento (MBE).....	14
	2.3.5 Preparación del medio ME20.....	15
	2.3.6. Preparación del medio ME10.....	15
2.4	Composición y Preparación de las Soluciones.....	15
	2.4.1 Solución basal de enquistamiento.....	15
	2.4.2 Solución de Peptona.....	16
	2.4.3 Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS).....	16
	2.4.4 Soluciones 12x de MgCl ₂ , MnCl ₂ , CoCl ₂ , CaCl ₂ NaCl, Glucosa, Tetraborato de sodio y Manitol.....	17
	2.4.5 Solución Salina de Enquistamiento (SSE).....	18
	2.4.6 Solución Amortiguadora de fosfatos de Sorensen.....	18
	2.4.7 Solución de peróxido de hidrógeno.....	19
	2.4.8 Solución Amortiguadora de Cacodilatos 0.1 M.....	19
	2.4.9 Solución de Glutaraldehído.....	20
2.5	Preparación de los Detergentes.....	20
	2.5.1 Dodecilsulfato de Sodio (SDS).....	20
	2.5.2 Sarcosyl al 0.2%.....	20

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
2.6	Preparación de las Enzimas.....21
2.6.1	Preparación de Mezcla Quitinasa y Tripsina.....21
3	METODOS
3.1	Tratamiento del Material Para el Cultivo de Amibas.....21
3.1.1	Lavado.....21
3.1.2	Esterilización del Material.....22
3.2	Cultivos Amibianos Axénicos.....22
3.2.1	Curva de Crecimiento.....22
3.2.2	Mantenimiento de las Cepas de Referencia.....22
3.3	Enquistamiento.....23
3.3.1	Estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> formadas de manera espontánea en MedioPEHPS (ESQ`s).....23
3.3.2	Inducción al enquistamiento.....23
3.4	Cosecha de Quistes.....23
3.5	Determinación del tiempo óptimo de enquistamiento.....23
3.6	Pruebas de resistencia de quistes de <i>E. histolytica</i> a diferentes concentraciones de SDS.....24
3.7	Selección de una cepa de <i>E. histolytica</i> capaz de enquistarse.....24
3.8	Influencia del LCR y del PACSR sobre el enquistamiento.....25
3.9	Evaluación de la calidad biológica de los quistes.....25
3.9.1	La calidad biológica.....25
3.9.2	La calidad global.....27
3.9.3	La calidad global relativa.....27
3.10	Optimación de un Medio por el Método Simplex.....28
3.10.1	El método Simplex modificado para múltiples variables y múltiples respuestas.....28
3.10.2	Preparación de los medios de enquistamiento durante la optimación.....33
3.11	Método para evaluar la influencia del H ₂ O ₂ sobre el enquistamiento.....34
3.11.1	Preparación del medio con H ₂ O ₂34
3.12	Método para determinar la influencia del sedimento sobre el enquistamiento.....35
3.12.1	Preparación de los medios de enquistamiento con y sin sedimento.....35
3.13	Preparación de los quistes para microscopía electrónica.....35

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
3.14	Método para determinar la capacidad de desenquistarse <i>in vitro</i> de los quistes formados en medio de enquistamiento.....36
4	RESULTADOS
4.1	Estandarización de los medios de cultivo.....37
4.1.1	Curva de crecimiento de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>37
4.1.2	Determinación del tiempo óptimo de producción de ESQR resistentes al efecto de SDS al 0.4 y 1%.....38
4.2	Selección de una cepa de <i>E. histolytica</i> capaz de enquistarse.....38
4.3	Determinación de la influencia del LCR y el PACSR sobre el enquistamiento.....39
4.4	Incremento de la calidad biológica de los quistes.....39
4.4.1	Incremento de la calidad global relativa durante la fase 1 de optimación.....39
4.4.2	Determinación de factores no esenciales para el enquistamiento de <i>E. histolytica</i>41
4.4.3	Optimación de las concentraciones de los factores que influyen en el enquistamiento de <i>E. histolytica</i>42
4.4.4	Comparación de la calidad global de los quistes producidos en la fase 1 de optimación contra la calidad global de las ESQ formadas en medio PEHPS.....44
4.4.5	Comparación de las diferentes concentraciones de los factores en los medios donde se formaron los quistes con mejor, intermedia y peor calidad global de los quistes.....44
4.4.6	Optimación de la calidad global de los quistes de <i>E. histolytica</i> durante la fase 2.....45
4.4.7	Determinación de los valores y concentraciones óptimos de los factores durante la fase 2.....46
4.5	Influencia del H ₂ O ₂ sobre el enquistamiento.....48
4.5.1	Determinación de la influencia de diferentes concentraciones molares de H ₂ O ₂ sobre el potencial de óxido-reducción de los mejores medios de enquistamiento diseñados.....48
4.5.2	Determinación de la influencia del potencial de óxido-reducción del medio de enquistamiento sobre la calidad global de los quistes.....48
4.5.3	Comparación de la calidad global de los medios con H ₂ O ₂ contra el testigo.....50
4.6	Influencia del sedimento sobre el enquistamiento.....50

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
4.6.1	Comparación de la calidad global de los medios con sedimento y sin sedimento.....50
4.7	Comparación de la calidad global de los quistes formados en los medios desarrollados en este trabajo.....51
4.7.1	Calidad global de los quistes formados en los medios desarrollados.....51
4.8	Rendimiento de los medios de enquistamiento desarrollados en este trabajo.....52
4.8.1	Determinación del porcentaje de formación de quistes en los medios diseñados.....52
4.9	Concentraciones y valores de los medios en que se forman quistes con mejor calidad global.....52
4.9.1	Concentraciones de factores en los mejores medios de enquistamiento diseñados.....52
4.9.2	Valores de condiciones fisicoquímicas de los medios donde se formaron los quistes de mejor calidad global.....53
4.10	Aspecto microscópico de los quistes formados en el mejor medio de enquistamiento.....54
4.10.1	Microscopía de luz de los quistes de <i>E. histolytica</i> formados en los medios desarrollados.....54
4.10.2	La ultraestructura de los quistes formados en los medios desarrollados.....58
4.11.	Comparación del incremento de los porcentajes de quistes que cumplen con los parámetros de calidad biológica formados en los mejores medios diseñados con respecto a los porcentajes de las ESQ's formadas en medio PEHPS.....60
4.11.1	Incremento en los porcentajes de quistes que cumplen con los parámetros de calidad biológica.....60
4.12	Determinación de la capacidad de desenquistarse.....61
4.12.1.	Determinación de la capacidad de desenquistamiento de los quistes formados en el medio 21p10.....61
5	DISCUSION
5.1	Discusión.....61
5.2	Conclusiones.....72
5.3	Perspectivas.....73
5.4	Contribuciones.....74
6.1	Bibliografía.....75

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Curva de crecimiento de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	37
2. Relación temporal de formación de ESQR's resistentes a SDS al 1%.....	38
3. Incremento de la calidad global relativa de los quistes de <i>E. histolytica</i> por efecto de diez factores químicos. Se analizó el efecto de concentraciones variables de los siguientes factores: Suero bovino, glucosa, LCR, extracto de hígado y páncreas, mezcla de vitaminas 109 de Diamond, Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Ca ²⁺ , B ³⁺	40
4. Identificación de factores no esenciales para el enquistamiento de <i>E. histolytica</i>	41
5. Identificación de los factores esenciales para el enquistamiento y determinación de la concentración en la que se producen los quistes de mejor calidad global.....	43
6. Incremento de la calidad global relativa de los quistes de <i>E. histolytica</i> por efecto de cuatro factores fisicoquímicos y un factor químico. Se analizó el efecto de condiciones variables de los siguientes factores: temperatura, pH, osmolaridad, potencial de óxido-reducción y concentraciones variables de fosfatos.....	46
7. Identificación y determinación de los valores y concentraciones óptimas de los factores de la fase II.....	47
<hr/>	
8. Influencia de diferentes concentraciones de H ₂ O ₂ sobre la calidad biológica de los quistes de <i>E. histolytica</i> formados en los medios 21 y 21-C.....	49
9. Observaciones microscópicas de quistes, ESQ y trofozoítos en fotomicroscopio Axiophot con técnica de contraste de fases, aumento de 100x.....	55
10. Observaciones en fotomicroscopio Axiophot con técnica de contraste de fases de trofozoítos, ESQ, ESQR y quistes, aumento de 100x.....	57
11. Observaciones microscópicas de cortes semifinos de quistes de <i>E. histolytica</i> formados axénicamente en los medios 21, 21-C y 21p10, teñidos con tetraóxido de osmio y observados en fotomicroscopio Axiophot en campo claro y aumento de 100x.....	58
12. Observaciones en microscopio electrónico de transmisión de los quistes formados en los medios 21, 21-C y 21p10	59
13. Incremento en los parámetros de calidad biológica en los quistes formados en los mejores medios diseñados.....	60

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Volúmenes de las soluciones de Sorensen utilizadas para alcanzar diferentes valores de pH.....	19
2	Límites iniciales de concentraciones de factores durante la fase 1 de optimación.....	29
3	Concentraciones y valores iniciales de cada factor analizado durante la fase 2 de optimación.....	30
4	Influencia del LCR y PACSR sobre la calidad global de los quistes de <i>E. histolytica</i> formados en medio 10 en condiciones axénicas.....	39
5	Incremento en calidad global de los quistes formados en diferentes medios durante la fase.1 de optimación.....	44
6	Composición de los medios de enquistamiento con peor, intermedia y mejor calidad global durante la Fase 1 de optimación.....	45
7	Valores de potencial de óxido-reducción en medios con diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	48
8	Influencia del sedimento sobre la Calidad global en los medios con peróxido.....	51
9	Calidad global de los quistes formados en los medios desarrollados en este trabajo.....	51
10	Porcentaje de formación de quistes en medios diseñados.....	52
11	Composición de los medios en que se forman los quistes con mejor calidad global.....	53
12	Condiciones fisicoquímicas de los medios donde se produjeron los quistes con mejor calidad global.....	53

NOMENCLATURA

B³⁺	Ion boro
C	Valores promedio
°C	Grados Celsius
CaCl₂	Cloruro de calcio
c.b.p.	Cuanto baste para
CH₃COONa	Acetato de sodio
cm	Centímetros
CO₂	Dióxido de carbono
CoCl₂	Cloruro de cobalto
cols	Colaboradores
DNA	Acido desoxiribonucleico
EHP	Extracto de hígado y páncreas
ESQ	Estructuras semejantes a quistes
ESQR	Estructuras semejantes a quistes resistentes al efecto de SDS al 1%
Fig	Figura
g	Gramos
h	Horas
HCl	Acido clorhídrico
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
K	Variables
KCl	Cloruro de potasio
K₂CO₃	Carbonato de potasio
K₂HPO₄	Fosfato de potasio dibásico
KH₂PO₄	Fosfato de potasio monobásico
KOH	Hidróxido de potasio
L	Litros
LCR	Preparado comercial rico en lípidos y colesterol
M	Concentración molar

MBE	Medio basal de enquistamiento
ME	Medio de enquistamiento
ME10	Medio de enquistamiento del grupo 10 de la tesis de Eduardo Campos Góngora (PEHPS + $MgCl^{2+}$ 4 mM, $MnCl^{2+}$ 10 mM y $CoCl^{2+}$ 10 mM.)
ME20	Medio de enquistamiento del grupo 20 de la tesis de Eduardo Campos Góngora (PEHPS + $MgCl_2$ 1.22 mM, $MnCl_2$ 14.44 mM y $CoCl_2$ 19.44 mM)
mg	Miligramos
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
$MgSO_4$	Sulfato de magnesio
min	Minutos
mOsm/kg	Milosmoles por kilo
ml	Mililitros
mM	Concentración milimolar
mm	Milímetros
μ l	Microlitros
μ m	Micrómetros
$MnCl_2$	Cloruro de manganeso
mv	Milivolt
N	Concentración normal
NaCl	Cloruro de sodio
Na_2CO_3	Carbonato de sodio
NH_2CONH_2	Urea
NaOH	Hidróxido de sodio
<i>p</i>	Significancia estadística (probabilidad de error tipo I)
PACSR	Sustituto de suero para el cultivo axénico de protozoarios
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PEHPS	Medio de cultivo para <i>E. histolytica</i>

pH

rpm

SDS

SSE

u

Vit

Potencial de hidrógeno

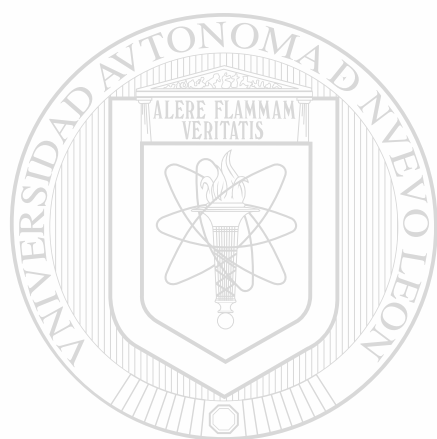
Revoluciones por minuto

Dodecilsulfato de sodio

Solución salina de enquistamiento

Unidades enzimáticas

Mezcla de vitaminas # 109 de Diamond



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Franciso González Salazar

Fecha de graduación : Septiembre, 1998

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Título del Estudio:

EFFECTO DE FACTORES QUÍMICOS Y FÍSICOQUÍMICOS SOBRE LA CALIDAD BIOLÓGICA DE QUISTES DE *Entamoeba histolytica* FORMADOS EN CONDICIONES AXÉNICAS

Número de páginas: 101 ciencias

Candidato para el grado de maestría en con especialidad en Microbiología

Area de estudio: Microbiología médica

Propósito y método de estudio:

El protozooario *Entamoeba histolytica* es el agente etiológico de la amibiasis. La amibiasis es un problema de salud pública. El ciclo vital de *E. histolytica* tiene dos etapas principales: trofozoito (forma invasiva) y quiste (forma infectiva). El principal obstáculo para estudiar los quistes de *E. histolytica* consiste en la falta de un medio y un método que permitan la producción de cantidades suficientes de quistes en condiciones axénicas. ®

Recientemente en nuestro laboratorio se descubrió que *E. histolytica*, cuando se cultiva en condiciones axénicas en medio PEHPS es capaz de formar estructuras semejantes a quistes naturales, pero con pared inmadura (ESQ). Cuando el medio PEHPS se adiciona con Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} la resistencia de las paredes al efecto de SDS al 1% y el contenido de quitina en estas estructuras se incrementa más de 100 veces, produciéndose estructuras semejantes a quistes resistentes (ESQR). Sin embargo, la calidad biológica de estas estructuras es todavía susceptible de mejorarse. El propósito de nuestro estudio fue: Diseñar un medio de cultivo que permitiera la producción masiva de quistes de *E. histolytica* condiciones axénicas con mejor calidad biológica que las ESQ y ESQR.

Utilizamos el método Simplex modificado para múltiples variables y múltiples respuestas para determinar los valores y concentraciones óptimos en el medio de cultivo de 11 factores químicos y 4 condiciones fisicoquímicas. Los factores analizados fueron % de suero bovino, % de LCR, % de extracto de hígado y páncreas, % de mezcla de vitaminas 109 de Diamond, concentraciones de glucosa, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , B^{3+} y fosfatos. Los factores fisicoquímicos a estudiar fueron: temperatura, pH, potencial de óxido reducción, osmolaridad. La calidad global de los quistes formados se expresó como la media geométrica de los porcentajes de quistes que fueron refringentes, resistentes a sarcosyl al 0.1%, con citoplasma normal, con núcleos, con morfología normal y con superficie lisa y refringente que sugiere la presencia de pared celular, en proporción al total de quistes producidos. La calidad global relativa fue el producto de dividir la calidad global de los quistes producidos en el medio en estudio entre la calidad global de los quistes producidos en el medio testigo. Se probaron 25 medios de enquistamiento y 15 condiciones fisicoquímicas hasta alcanzar la mejor calidad global relativa posible.

Contribuciones y conclusiones:

Utilizando el método Simplex, se diseñó un nuevo medio de cultivo para *E. histolytica* en condiciones axénicas donde se formaron quistes que observados en microscopio de luz son muy similares a los naturales, por primera vez se logró formar una pared gruesa, electrodensa, visible con ME de transmisión, pero esta pared se desprende de la superficie de los quistes. Además los quistes formados en este nuevo medio de cultivo tienen una calidad biológica 2.18 veces superior a la de las esq desarrolladas en medio PEHPS.

El rendimiento promedio de los quistes formados en este nuevo medio de cultivo fue cercano a un 60%, lo que permite la producción masiva de quistes con las características arriba mencionadas.

Firma del Asesor



Dr. Salvador Said Fernández

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Amibiasis

La amibiasis es una enfermedad causada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*. Esta enfermedad se caracteriza por la producción de lesiones, principalmente en el hígado y el colon de las personas infectadas. Las formas clínicas más frecuentes son la disentería clásica y el absceso hepático (Petri WA, 1996).

La amibiasis es un problema de salud pública, principalmente en los países en desarrollo (Walsh JA, 1988). En el mundo hay 500 millones de personas infectadas por *E. histolytica* o *Entamoeba dispar* y solamente una de cada 10, muestran síntomas de la enfermedad (Walsh, J. A. 1988). Cada año la amibiasis causa de 40,000 a 120,000 muertes (Petri WA, 1996).

En México, se calcula que entre el 10 y 20% de la población son portadores de amibas (Gutiérrez G, 1987) y más de un millón de casos son tratados por año (García-Manzo NT, 1997). En algunos estados como Chiapas, Guerrero, México, Jalisco, Oaxaca, Veracruz y el Distrito Federal se considera un problema muy importante de salud pública (Gutiérrez G, 1987).

1.2 Taxonomía

Actualmente se acepta que existen dos especies de amibas. Las cuales son morfológicamente idénticas, sólo pueden ser diferenciadas por análisis de isoenzimas y tipificadas por anticuerpos monoclonales contra antígenos de superficie. Una de estas especies (*E. histolytica*) es patógena y otra (*E. dispar*) es no patógena. *E. histolytica* es la especie responsable de todos los casos de colitis amibiana y absceso hepático, además puede producir colonización asintomática del intestino. Nunca se ha documentado que *E. dispar* produzca colitis amibiana o absceso hepático (Petri WA, 1996, Clark GC, 1994, WHO, 1997).

1.3 Ciclo Biológico de *E. histolytica*:

El ciclo de vida de *E. histolytica* consta de cuatro etapas, trofozoito (forma invasiva), prequiste, quiste (forma infectiva) y amibas metaquísticas. Los trofozoítos son las formas vegetativas y los responsables de las lesiones de los enfermos con amibiasis, se multiplican por fisión binaria en la luz del intestino humano, desde donde pueden invadir la pared del colon, el hígado u otros órganos. Los quistes son las formas infectivas. Bajo ciertas condiciones, normalmente desfavorables para los trofozoítos, estos se diferencian convirtiéndose en prequistes, luego en quistes mononucleados y finalmente en quistes maduros tetranucleados. Los quistes salen del intestino con las heces fecales y llegan al intestino del nuevo hospedero cuando son ingeridos en alimentos o agua contaminados.

Completan su ciclo biológico al perforar su pared para producir una amiba metaquística, que al dividirse produce ocho trofozoítos mononucleados (Martinez-Palomo A, 1982).

A diferencia de los trofozoítos, los quistes maduros de *E. histolytica* permanecen viables por períodos prolongados en un amplio rango de condiciones medio-ambientales. Esta resistencia les permite conservar su capacidad de infectar al hombre después de permanecer en heces, agua o suelo hasta por ocho días, a temperaturas entre 28°C y 34°C y hasta por un mes a 10°C (Diamond LS, 1990).

Los quistes tienen pared, los trofozoítos no. La pared constituye uno de los organelos más importantes de los quistes porque les confiere su resistencia y forma características. La función biológica de la pared quística es la de proteger a la célula en criptobiosis de condiciones de hipoosmolaridad y otros factores desfavorables, como el efecto de algunas sustancias tóxicas (Neff RJ, 1962, Arroyo-Begovich A, 1980).

1.4 Estructura de la pared quística

Las características estructurales generales de las paredes quísticas de protozoarios patógenos de los géneros *Entamoeba*, *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Giardia* son las siguientes:

- a) Están formadas por una o dos capas. Al menos una de ellas tiene polisacáridos como componentes mayoritarios.
- b) Los polisacáridos sirven como matriz y dan rigidez y resistencia a la pared.
- c) Sobre la matriz de polisacáridos se organizan diversos lipopolisacáridos y glicoproteínas.

d) Los polisacáridos normalmente se encuentran formando capas superpuestas.

La pared de *Neurospora crassa* y la de algunas otras especies de hongos guarda numerosas similitudes con las paredes quísticas de las especies antes mencionadas. Pero además, se sabe que los estratos fibrilares de los polisacáridos de *N. crassa* están formados por cadenas largas y cortas de quitina. Las cadenas cortas están unidas a las largas mediante enlaces covalentes formando entrecruzamientos (Farkas V, 1979).

La pared quística de amibas de vida libre, como las de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* está compuesta en gran parte por polisacáridos de los cuales aproximadamente un tercio es celulosa (Potter JL, 1976, Tomlimson G, 1962). En cambio, la composición química de las amibas del género *Entamoeba* no se ha esclarecido del todo, McConnachie en 1969 identificó en la pared quística de *E. invadens* un complejo proteína-carbohidrato. Arroyo-Begovich y cols. informaron que el componente mayoritario de la pared de quistes de *E. invadens* es quitina (Arroyo-Begovich A, 1980). La quitina es un polímero de N-acetilglucosamina con enlaces β 1 \rightarrow 4. La composición química de las paredes de los quistes de *Giardia lamblia* constituye una tercera posibilidad, no tienen ni quitina ni celulosa como componentes mayoritarios. Sino un polisacárido compuesto por galactosamina, sola o en combinación con otros carbohidratos. Esta estructura puede existir como polisacárido, glicoproteína, proteoglicano o glicolípido (Jarrol EL, 1989, Erlandesen SL, 1989).

1.5 El enquistamiento

La diferenciación de *E. histolytica* desde trofozoítos a quistes y viceversa, incluyendo los procesos de enquistamiento y desenquistamiento permanece como uno de los aspectos más oscuros en la biología de este parásito. A pesar de su importancia se ha prestado muy poca atención al estudio de la biología celular y molecular de los quistes (Martínez-Palomo A, 1993). El principal obstáculo para estudiar los quistes de *E. histolytica* en condiciones axénicas consiste en la falta de un medio y un método que permitan su producción en cantidades suficientes (Diamond LS, 1990).

Por el contrario la diferenciación y la biología celular de *E. invadens* han sido muy estudiados. El interés de su estudio radica en la cercanía filogenética con *E. histolytica*. *E. invadens* parasita el intestino y otros órganos de reptiles y es capaz de enquistarse en condiciones axénicas. Esto último es posible gracias al medio descrito por Bailey y Rengpien (1980).

Recientemente, nuestro grupo describió el medio PEHPS para el cultivo axénico de amibas del género *Entamoeba* (Said-Fernandez S y cols, 1988) y se encontró que en este medio las cepas HK9 y HM-1 forman estructuras semejantes a quistes (ESQ) muy parecidas a los quistes naturales, pero con una pared anormal o inmadura (Said-Fernandez S y cols, 1993, Said-Fernandez S y cols, 1990). Nuestro grupo también observó que después de la fase de crecimiento logarítmico, las amibas mantenidas axénicamente en medio PEHPS experimentan una sensible disminución de densidad y volumen celular y una o dos divisiones nucleares. Es decir, se forman ESQ tetranucleadas, cuya apariencia al microscopio

es indistinguible de la de los quistes naturales cuando ambos son teñidos con el método de Gomori (Said-Fernandez S. y cols, 1993).

Tanto los quistes naturales como las ESQ formadas en condiciones axénicas de *E. histolytica* tienen afinidad por calcoflúor white M2R. Además, los quistes naturales unen a su superficie γ -globulinas específicas contra quistes formados en condiciones axénicas, los trofozoítos no muestran afinidad por estos anticuerpos (Said-Fernandez S y cols, 1993).

Cuando las ESQ de *E. histolytica* obtenidas en condiciones axénicas se tratan con KOH saturado por una hora a 121°C se obtiene un material particulado con intensa afinidad por el calcoflúor white M2R (Said-Fernandez S y cols, 1988). Todas estas observaciones sugieren fuertemente que *E. histolytica* es capaz de sintetizar durante el enquistamiento una hexapiranososa con enlaces β 1→4 (Maeda H, 1967), en condiciones axénicas.

Experimentos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que las ESQ de *E. histolytica*, formadas en medio PEHPS, en condiciones axénicas, tienen la propiedad de unir aglutinina de germen de trigo en proporciones mucho mayores que los trofozoítos, sobre todo en presencia de una mezcla de sales que contiene Co^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} . También se ha observado que cuando se agrega Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} al medio de cultivo, el 4.4% de las estructuras semejantes a quistes formadas, son resistentes a SDS al 1% (ESQR). Lo cual sugiere fuertemente que estas estructuras son capaces de sintetizar una pared mucho más resistente que la de las ESQ formadas espontáneamente en cultivos envejecidos en PEHPS (Campos-Góngora E, 1996). En el análisis cromatográfico de las ESQR de *E. histolytica* formadas en presencia de Co^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} se ha demostrado un incremento de más de

cien veces en la síntesis de N-acetilglucosamina en relación a los trofozoítos y a las ESQ que se forman de manera espontánea en medio PEHPS (Campos-Góngora E, 1996).

1.6 Factores que inducen el enquistamiento

El enquistamiento en los protozoarios se inicia como una respuesta de defensa contra prácticamente cualquier factor del medio ambiente que comprometa la vida de las formas tróficas. Por ejemplo, *E. histolytica* se enquista en cultivos envejecidos (Said-Fernandez S y cols, 1993), *E. invadens* se diferencia en condiciones axénicas cuando se incuba en un medio con bajas concentraciones de glucosa (Vazquezdelara-Cisneros-LG; Arroyo-Begovich-A, 1984), en medios diluidos con agua (Rengpien S, Bailey GB. 1975), o altas concentraciones de CO₂ disuelto (Morales-Vallarta M, 1995). *Naegleria fowleri* forma quistes en cultivos envejecidos (John DT, 1982), *Acanthamoeba castelanii* es capaz de enquistarse *in vitro*, en las condiciones arriba señaladas, y también en presencia de inhibidores de síntesis de DNA ó proteínas (Weisman RA, 1976), escasa disponibilidad de nutrientes, valores extremos de pH, presencia de cationes divalentes e hipoosmolaridad (Byers JT, 1979). En esta misma especie, el MgSO₄ y el CaCl₂ juegan un papel importante durante el enquistamiento (Byers JT; 1991).

En condiciones *in vitro* el suero bovino es esencial para el enquistamiento de *E. invadens*. *E. invadens* también puede enquistarse en medios con baja concentración de glucosa, independientemente de la osmolaridad y las concentraciones de oxígeno del medio (Vazquezdelara-Cisneros LG, Arroyo-Begovich A, 1984).

El enquistamiento de *A. castelanii* también depende de varios factores. Los más importantes son la temperatura, pH y la osmolaridad (Kadlec V, 1975). El pH es un factor

importante para incrementar la actividad de la enzima fenol-oxidasa de *A. castellanii* localizada en la pared del parásito, la actividad de esta enzima incrementa la resistencia química y mecánica de los quistes formados en un medio de enquistamiento (Sykes DE, 1985)

La concentración de calcio en los medios de cultivo es importante durante el enquistamiento de *Azotobacter vinelandii*. La suspensión de células de este microorganismo en medios deficientes de calcio resulta en un enquistamiento abortivo, con liberación de quistes inmaduros cubiertos de material viscoso. Los niveles adecuados de calcio en los medios de cultivo producen quistes maduros con una cubierta externa bien formada (Page WJ, 1975).

Algunas de las enzimas responsables de la síntesis de Galactosamina durante el enquistamiento de *G. lamblia* requieren de fosforilación para mantenerse en su forma activa. La galactosamina es uno de los azúcares que componen la pared de este protozoo (Macechko PT, 1992).

Un sustituto de suero para el cultivo axénico de protozoarios (PACSR), desarrollado por nuestro grupo, ha demostrado ser útil como suplemento para el desarrollo de *E. histolytica* en condiciones axénicas (Mata-Cárdenas BD, 1996).

El Boro, en pequeñas cantidades favorece la resistencia a choques hipoosmóticos de las paredes de células vegetales y de algunos insectos. Se ha propuesto que ello se debe a que este metal funciona como puente de enlace entre diversos componentes moleculares de las paredes (Cassab GI, 1995).

1.7 El Método Simplex:

Es un método sistemático de optimización de tipo secuencial, aplicable a sistemas en que debe considerarse el efecto de múltiples factores interactuantes sobre una respuesta determinada y que se utiliza para optimar resultados analizando al mismo tiempo todos los factores que intervienen en un ensayo (Shavers CL, 1979).

1.8 Hipótesis

Utilizando el método Simplex es posible diseñar un medio de cultivo con la combinación adecuada de factores químicos y condiciones fisicoquímicas para favorecer la formación de quistes de *E. histolytica* en condiciones axénicas con mejor calidad biológica que las ESQ y ESQR.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo General.

Diseñar un medio en el que se formen quistes de *E. histolytica* en condiciones axénicas con mejor calidad biológica que las ESQ y ESQR.

1.9.2 Objetivos específicos.

- 1).- Seleccionar una subpoblación de amibas de la cepa HM-1:IMSS que sea capaz de enquistarse con una alta eficiencia.
- 2).- Analizar el efecto del suero, de un preparado comercial rico en lípidos y colesterol (LCR) y del (PACSR) sobre el enquistamiento.

3).- Analizar mediante el método Simplex, el efecto de los siguientes factores químicos y/o condiciones fisicoquímicas sobre la calidad biológica de los quistes de *E. histolytica* formados en condiciones axénicas:

- (1) Suero bovino,**
- (2) LCR o PACSR,**
- (3) Glucosa,**
- (4) Boro,**
- (5) Calcio,**
- (6) Magnesio,**
- (7) Manganeso,**
- (8) Cobalto,**
- (9) Extracto de hígado y páncreas,**
- (10) Mezcla de vitaminas # 109 de Diamond,**
- (11) Fosfatos,**
- (12) Temperatura,**
- (13) pH,**
- (14) Potencial redox,**
- (15) Osmolaridad.**

(5).- Analizar la apariencia ultramicroscópica de los quistes formados en el medio en que se obtuvo la mejor calidad biológica.

(6).- Analizar la capacidad de los quistes formados en los medios desarrollados, para desenquistarse *in vitro*.

CAPITULO 2

MATERIALES

2.1 Origen de los Reactivos.

Todos los reactivos utilizados durante el desarrollo de esta tesis fueron de grado analítico, a menos que se especifique lo contrario.

Sigma Chem Co. (St. Louis Mo., USA): ácido ascórbico, azida de sodio, L-cisteína, dodecilsulfato de sodio (SDS), Sarcosyl, cloruro de magnesio, cloruro de manganeso, cloruro de cobalto, cloruro de calcio, D-(+)-glucosa, quitinasa, ácido cacodílico, D-manitol, tetraborato de sodio, fosfato de sodio dibásico, LCR, cromotrópo 2R, SF verde claro.

Merck (México): acetato de sodio, cloruro de sodio, ácido fosfotúngstico.

Pelco® Grids & Electron Microscopy Supplies TED PELLA, Inc.(Tustin, C.A; USA): glutaraldehído grado microscopía electrónica.

Productos Químicos Monterrey: hidróxido de potasio, fosfato dibásico de potasio, fosfato monobásico de potasio, ácido clorhídrico, cloruro de calcio, urea, hidróxido de sodio, carbonato de potasio, iodo, yoduro de potasio.

Bioxón (Becton Dickinson, México): peptona de caseína.

Técnica Química (México): cloruro de potasio.

J.T. Baker (México): alcohol etílico absoluto, bicarbonato de sodio, xileno, ácido acético glacial.

Aldrich Chem Co. (Milw. Wi; USA): manosa, galactosa, ácido N-acetilmurámico, ácido N-acetilneuramínico, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y fucosa.

Mallinckrodt Chemical Works: cloruro de mercurio.

DIFCO: L-cistina.

2.2 Material Biológico

2.2.1 Amibas.

Para este trabajo se utilizó la cepa HM-1:IMSS de *E. histolytica* (Diamond LS, 1968), mantenida en condiciones axénicas (Said-Fernández S y cols, 1988) en este laboratorio por 18 años.

2.3 Preparación de los Medios de Cultivo

2.3.1 Extracto de Hígado y Páncreas (EHP) (Said-Fernández S y cols, 1988).

Para cada lote de EHP se utilizaron 350 g de páncreas de bovino, 350 g de páncreas de cerdo y 1000 g de hígado de bovino. El hígado y páncreas se limpiaron de tejido conectivo y se lavaron con NaCl al 0.85%. Los órganos se cortaron en trozos pequeños y se molieron con un molino eléctrico (Tor-Rey, Monterrey, N.L. México) y el producto se licuó con una licuadora de 2 L de capacidad y se mezcló con 1.354 volúmenes de PBS, pH 8.0 precalentado a 56 °C. Para ajustar el pH se agregaron 10 ml de NaOH 10 N por cada 2,800 ml del licuado y se incubaron 4 h a 37 °C. La mezcla se colocó en un vaso de precipitado de 4 L de capacidad, de polipropileno (Nalgene Labware Division, N.Y., USA) y se calentó en autoclave a 121 °C por 15 min. Inmediatamente después se separó el sobrenadante con un colador y el líquido se filtró a través de ocho gasas superpuestas. El producto se mezcló con 250 ml de tierra de diatomeas (Hiflo Estándar)/litro de extracto y luego se filtró, pasándolo a través de un colchón de 400 ml de tierra de diatomeas (Estándar Super Cell) sobre matraz Kitasato de 4 L. El colchón se preparó suspendiendo 200 ml de tierra en agua desionizada, aforando a 1 L. La mezcla se hizo pasar a través de un filtro Whatman # 1 (Whatman, Laboratory Division; Springfield Mill, Maidstone Kent., England), colocado sobre un embudo Buchner, dejando la tierra compacta pero evitando que se formaran grietas. El producto final se almacenó a -20 °C hasta el momento de usarlo.

2.3.2 Preparación del medio PEHPS (Said-Fernández y col., 1988).

Ingredientes:

EHP	250 ml
Peptona de caseína.....	10 g
Glucosa	6 g
L-cisteína	1 g
Ácido ascórbico.....	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Agua desionizada c.b.p.	1000 ml

Preparación: Inmediatamente antes de usarse el EHP se descongeló en baño de agua a 37 °C y se filtró haciéndolo pasar a través de un filtro Whatman # 1, con ayuda de vacío. El filtrado se mezcló con el resto de los componentes sólidos. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N y se aforó a 1000 ml con agua desionizada y se comprobó que la osmolaridad del medio estuviera entre 280 y 320 mOsm/kg. (Micro Osmometer, Modelo 3MO Plus; Advanced Instruments, Inc. Norwood, MA. USA). El medio se distribuyó en alícuotas de 10 ml, en tubos para cultivo de 16 x 125 mm, con tapón de rosca (Pyrex, Mty, N.L. Méx.). Los tubos se esterilizaron en autoclave, a 121 °C, por 15 min, dejando flojos los tapones de los tubos. Inmediatamente después de la esterilización los tapones se apretaron. El medio se almacenó a temperatura ambiente hasta el momento de su uso.

2.3.3 Preparación y adición de suero bovino

El suero bovino se obtuvo a partir de sangre de ganado bovino recién sacrificado en un rastro local. La sangre se colectó en matraces de 2 L de polipropileno (Nalgene Labware Division, N.Y., USA), se trasladó al laboratorio y ahí se incubó durante 4h a 37°C. Luego se incubó por 18 h a 6 °C. El suero se decantó en frascos de polipropileno para centrífuga de 1L de capacidad (Sorvall, Dupont Norwalk, Conecticut, USA) y se centrifugaron 3 veces a

1680g. Se descartó el sedimento y el sobrenadante de todos los frascos se mezcló en una tina comercial de plástico. Se distribuyó en alícuotas de 4 L en botellas de plástico sin marca y se almacenó a -20°C hasta su uso. Para esterilizar el suero se descongeló una botella por vez en baño de agua a 37°C . Se filtró, haciéndolo pasar a través de un swinex de 47 mm (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA.) conteniendo membranas de filtración con la mezcla acetato-celulosa de 8.0, 5.0, 3.0, 1.2, 0.8, 0.45, 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA.), iniciando con la de 8.0 μm y finalizando con la de 0.22 μm y repitiendo el paso por ésta última en dos ocasiones. Inmediatamente después, el suero se filtró de nuevo bajo condiciones de asepsia con ayuda de una jeringa de vacío Manostat (Laboratory Instrument and Scientific Apparatus, USA.), un swinex estéril de 25 mm (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA.) y una membrana de filtración con la mezcla acetato-celulosa de 0.22 μm (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA.). El filtrado se distribuyó en alícuotas de 100 ml en frascos estériles de borosilicato con tapón de rosca. Los frascos se cerraron y se incubaron durante 30 min a 56°C para descomplementar. Luego se les dejó enfriar a temperatura de laboratorio. Se realizó la prueba de esterilidad, agregando 1 ml de suero de cada uno de los frascos en 10 ml de medio estéril preparado en tubos para cultivo con tapón de rosca de 16 x 125 mm (Pyrex, Mty, N.L. Mex.) e incubándolos a 37°C por 7 días. Los frascos con el suero bovino estéril se congelaron a -20°C , hasta su uso. Para agregar el suero estéril al medio PEHP se descongeló en baño de agua a 37°C y se agregó 1 ml en 10 ml de medio estéril preparado en tubos para cultivo con tapón de rosca de 16 x 125 mm. En el caso de los medios de enquistamiento se utilizaron diferentes volúmenes de suero agregados a 6 ml de solución basal o solución de peptona.

2.3.4. Medio Basal Para Enquistamiento (MBE).

El MBE se preparó de la misma manera que el medio PEHP, sólo que al MBE no se le agregaron fosfatos y los tubos de cultivo se llenaron con 7 ml en vez de 10.

2.3.5 Preparación del medio ME20

Se vaciaron 7 ml de medio basal de enquistamiento en tubos de borosilicato con tapón de rosca y se esterilizaron en autoclave. Luego, en condiciones de esterilidad, se agregó 1 ml de cada una de las siguientes soluciones: suero bovino, solución salina de enquistamiento y MgCl_2 1.22 mM, MnCl_2 14.44 mM y CoCl_2 19.44 mM

2.3.6. Preparación del medio ME10.

Se vaciaron 7 ml de medio basal de enquistamiento en tubos de borosilicato con tapón de rosca y se esterilizaron en autoclave. Luego, en condiciones de esterilidad, se agregó 1ml de cada una de las siguientes soluciones: suero bovino, solución salina de enquistamiento y MgCl_2 4 mM, MnCl_2 10 mM y CoCl_2 10 mM.

2.4 Composición y Preparación de las Soluciones

Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada, con una resistividad de 4 megaohms. El agua se desionizó en un desionizador Barstead (Barstead Co. Division of SYBRON Corporation, Boston, MA. USA).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.4.1 Solución basal de enquistamiento.

Composición.

Peptona de caseína.....	10 g
L-cisteína	1 g
Ácido ascórbico.....	0.2 g
Agua desionizada c.b.p.	1000 ml

Preparación: los componentes se disolvieron con agua desionizada, por agitación magnética. El pH se ajustó a 7.0 con NaOH 10 N. y se aforó a 1000 ml con agua

desionizada. La solución se distribuyó en alícuotas de 6 ml, en tubos de cultivo. Los tubos se esterilizaron en autoclave y se almacenaron como se hizo con el medio PEHPS.

2.4.2 Solución de Peptona

Composición.

Peptona de caseína..... 10 g
Agua desionizada c.b.p. 1000 ml

Para su preparación la peptona se disolvió en agua desionizada. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N. La solución se distribuyó en alícuotas de 6 ml, en tubos de cultivo. Los tubos se esterilizaron en autoclave y se almacenaron como se hizo con el medio PEHPS.

2.4.3 Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)(Diamond L.S. 1978).

Composición:

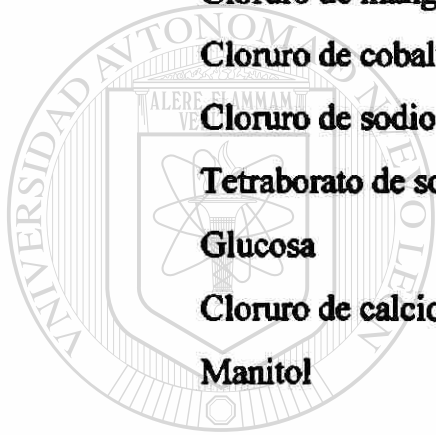
NaCl..... 6.5 g
K₂HPO₄..... 2.8 g
KH₂PO₄..... 0.4 g
Agua desionizada c.b.p.1000 ml

Los componentes se disolvieron, se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 10 N y se aforó a 1000 ml. La solución se distribuyó en alícuotas de 10 ml, se esterilizó en autoclave y se almacenó en refrigeración a 4 °C.

2.4.4 Soluciones 12x de MgCl₂, MnCl₂, CoCl₂, CaCl₂, NaCl, Glucosa, Tetraborato de sodio y Manitol.

Las diferentes concentraciones de las soluciones de MgCl₂, MnCl₂, CoCl₂, CaCl₂, NaCl, Glucosa, Tetraborato de sodio y Manitol que se probaron en este trabajo se calcularon por medio del método de optimación autodirigida Simplex secuencial para múltiples factores (Hendrix CD, Union Carbide, 1970; Shavers CL, 1979). Para su preparación se usaron:

Cloruro de magnesio hexahidratado
Cloruro de manganeso tetrahidratado
Cloruro de cobalto heptahidratado
Cloruro de sodio
Tetraborato de sodio
Glucosa
Cloruro de calcio
Manitol



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Las cantidades necesarias de cada sal se pesaron en una balanza analítica. Estas cantidades se calcularon para preparar una solución concentrada 12 veces con respecto a la concentración de la solución de trabajo (12X). Los componentes se disolvieron en agua desionizada y luego cada solución se aforó a 100 ml, se vació en frascos de borosilicato con tapón de rosca y se esterilizó en autoclave. Estas soluciones se usaron antes de 48 h de haber sido preparadas.

2.4.5 Solución Salina de Enquistamiento (SSE); (Mirelman D y Avron B, 1988).

Composición:

KCl.....	0.216 g
CH ₃ COONa.....	0.312 g
K ₂ CO ₃	0.372 g
Na ₂ CO ₃	0.372 g
NH ₂ CONH ₂	0.336 g

Los componentes se disolvieron en agua desionizada, el volúmen se aforó a 50 ml y se la solución se esterilizó por filtración bajo condiciones de asepsia con ayuda de una jeringa de vacío Manostat (Laboratory Instrument and Cientific Apparatus, USA.), swinex estéril de 25 mm

(Millipore Corporation, Bedford, MA, USA.) y membrana de filtración con la mezcla acetato-celulosa con tamaño de poro de 0.22 μ m (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA.). La solución se guardó a temperatura ambiente en botellas estériles de borosilicato de 125 ml con tapón de rosca. Esta solución se usó antes de 48 h de preparada.

2.4.6 Solución Amortiguadora de fosfatos de Sorensen 12x (Tablas científicas Ciba Geigy SA, 1971).

Se prepararon 2 soluciones diferentes: Sorensen A: la cual estaba compuesta por diferentes concentraciones molares de KH₂PO₄ y Sorensen B con diferentes concentraciones molares de Na₂HPO₄. Las concentraciones se calcularon por medio del método de optimación autodirigida Simplex secuencial para múltiples factores (Hendrix CD Union Carbide, 1970; Shavers CL, 1979). Para obtener la concentración deseada en los medios. Las concentraciones molares de las soluciones se prepararon 12 veces mayores a la solución de trabajo (12x). Diferentes volúmenes de las soluciones A y B se agregaron a la solución de peptona o solución basal de enquistamiento al momento de preparar el medio de acuerdo al pH deseado (tabla 1).

Tabla 1 Volúmenes de las soluciones de Sorensen utilizadas para alcanzar diferentes valores de pH.

pH	Soluciones	
	Sorensen A ^a	Sorensen B ^b
5.0	988	12
5.2	980	20
5.4	967	33
5.6	948	52
5.8	919	81
6.0	877	123
6.2	815	185
6.4	732	268
6.6	627	373
6.8	508	492
7.0	392	608
7.2	285	715
7.4	196	804
7.6	132	868
7.8	86	914
8.0	55	945
8.2	33	967

^a KH₂PO₄

^b Na₂HPO₄

^c Volumen en µl.

2.4.7 Solución de peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno al 30% se distribuyó en alícuotas de 2, 4, 6, 8 y 10 ml en tubos de borosilicato, aforando luego a 10 ml con agua bidestilada. Enseguida la solución se esterilizó por filtración bajo condiciones de asepsia con ayuda de una jeringa de vacío Manostat (Laboratory Instrument and Cientific Apparatus, USA.), swinex estéril de 25 mm (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA.) y membrana de filtración con la mezcla acetato-celulosa con tamaño de poro de 0.22 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA.) y se utilizó de inmediato.

2.4.8 Solución Amortiguadora de Cacodilatos 0.1 M.

Se diluyeron 1.601 g de ácido cacodílico con unos 80 ml de agua desionizada. Se ajustó el pH a 7.4 con HCl 0.1N ó NaOH 1N y el volumen se aforó a 100 ml con agua desionizada. La solución se esterilizó por filtración con ayuda de una jeringa de vacío Manostat (Laboratory Instrument and Cientific Apparatus, USA.), swinex estéril de 25 mm (Millipore Corporation,

Bedfar, MA, USA.) y membrana de filtración con la mezcla acetato-celulosa con tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA.) y se guardó en frascos estériles de borosilicato a 4 °C hasta su uso.

2.4.9 Solución de Glutaraldehído.

El contenido de una ampollita de 10 ml de glutaraldehído al 25% en solución acuosa (Grado microscopía electrónica; TED PELLA, Inc. Tustin, C.A; USA) se aforó a 100 ml con solución amortiguadora de cacodilatos 0.1 M, pH 7.4 para hacer una solución al 2.5%. Esta solución se esterilizó por filtración y se guardó a 4 °C en alícuotas de 10 ml, en tubos de borosilicato con tapón de rosca.

2.5 Preparación de los Detergentes

2.5.1 Dodecilsulfato de Sodio (SDS).

Se disolvieron 0.4 y 1.0 g de dodecilsulfato de sodio en agua desionizada. Las soluciones se aforaron a 100 ml y se almacenaron a temperatura ambiente, en un frasco de vidrio con tapón de rosca.

2.5.2 Sarcosyl al 0.2%.

Se disolvieron 0.2 g de la sal de sodio N-Lauroil sarcosina ($\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{NO}_3\text{Na}$) en 100 ml de agua bidestilada, mediante agitación magnética. Esta solución se guardó a temperatura ambiente en un frasco de vidrio con tapón de rosca.

2.6 Preparación de las Enzimas

2.6.1 Preparación de Mezcla Quitinasa y Tripsina.

El contenido de un frasco con 2.5 unidades de quitinasa de *Streptomyces griseus* (Sigma, Chemical Co.) más 10 mg de tripsina, se disolvieron con 2 ml de PBS (PBS 50 mM, pH 6.0). De esta solución se tomaron 800 μ l y se agregaron a un tubo Eppendorf que contenía 200 μ l de la muestra de quistes.

CAPITULO 3

MÉTODOS

3.1 Tratamiento del Material Para el Cultivo de Amibas

3.1.1 Lavado. (López-Revilla y Rodríguez-Báez, 1981).

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

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

Los bulbos contaminados con material biológico y los tapones de los recipientes de cultivo se remojaron en cloruro de benzalconio (dermo-Qrit; DERMO, MEX) al 1% por lo

menos 24 h y se enjuagaron 7 veces con agua de la llave y 4 veces con agua destilada, después se dejaron escurrir boca abajo a temperatura ambiente para secarlos.

3.1.2 Esterilización del Material.

En general, todo el material de vidrio para el cultivo de amibas se esterilizó en autoclave. Los tubos, frascos y botellas se esterilizaron con los tapones flojos, los cuales se apretaron al terminar el tiempo de esterilización estando aún calientes los tubos. El material así esterilizado se guardó protegido del polvo a temperatura ambiente, hasta su uso.

3.2 Cultivos Amibianos Axénicos (Said-Fernández S y cols, 1988)

3.2.1 Curva de Crecimiento.

Se inocularon 24 tubos de cultivo con 1×10^3 amibas/ml y se incubaron a 37 °C. Cada 24 h se determinó la densidad celular de 3 tubos en una cámara de Neubauer. Con los datos obtenidos se calculó la media y el error estándar a cada intervalo de la curva de crecimiento.

3.2.2 Mantenimiento de las Cepas de Referencia.

Entamoeba histolytica, cepa HM-1:IMSS. Antes de cada resiembra los cultivos se observaron en un microscopio invertido (Biovert, Reichert, Austria) para comprobar el buen estado morfológico y la movilidad de las amibas. De los tubos observados se escogió el mejor cultivo y se colocó en agua-hielo durante 10 a 15 min al término de los cuales el cultivo se homogeneizó por inversión suave del tubo (15 a 20 veces) y se determinó la densidad celular en un hematocitómetro.

En cada resiembra se inocularon 1×10^3 trofozoítos/ml en cada uno de 3 tubos con 11 ml de medio PEHPS y se incubaron a 37 °C; a los 4 días, cuando las amibas se encuentran en el segundo tercio de su fase logarítmica de crecimiento, se realizó la siguiente resiembra.

3.3 Enquistamiento

3.3.1 Estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* formadas de manera espontánea en Medio PEHPS (ESQ).

Las ESQ se obtuvieron inoculando 1×10^3 trofozoítos/ml en tubos de cultivo de 16 x 125 mm que contenían 11 ml de medio PEHPS, estos se incubaron a 37 °C durante 14 días al término de los cuales se cosecharon los quistes.

3.3.2. Inducción al enquistamiento

A los cultivos de *E. histolytica* en fase logarítmica de crecimiento (4 días de cultivo) en medio PEHPS se les cambió a ME. Esto se hizo en condiciones asépticas retirando por succión 9.5 partes del volumen de medio. Después se agregó el medio de enquistamiento recién preparado, transvasando directamente el medio de un tubo a otro. Estos cultivos se incubaron a 37 °C por 7 días.

3.4 Cosecha de Quistes

Los cultivos con quistes se enfriaron durante 10 min en agua-hielo, se centrifugaron por 15 min a $700 \times g$ (1500 rpm en centrífuga Sorvall con rotor de 24 cm de radio). El sobrenadante se eliminó por vacío y la pastilla se resuspendió en agua bidestilada o PBS. La suspensión se lavó 2 veces con PBS (cuando los quistes eran para ensayos de microscopía) o con agua desionizada (cuando estas células eran para determinar calidad global).

3.5. Determinación del tiempo óptimo de enquistamiento

Se inocularon 1×10^3 trofozoítos en 54 tubos de cultivo con medio PEHPS y se incubaron a 37°C durante 4 días hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmico. Luego los trofozoítos se inocularon en tubos conteniendo 12 ml de medio ME20 y se incubaron durante

7 días a 37°C. Las estructuras producidas en este medio se contaron cosechando 5 tubos diarios y contándolos con la ayuda de un hematocitómetro. Se calculó el promedio y la desviación estándar diarios. Luego se determinó la resistencia de las estructuras cosechadas a SDS al 0.4 y 1%. Las estructuras semejantes a quistes resistentes a SDS (ESQR) se contaron y se calculó el promedio y desviación estándar.

3.6 Pruebas de resistencia de quistes de *E. histolytica* a diferentes concentraciones de SDS.

Los quistes recién cosechados y suspendidos en 500 µl se inocularon en tubos Eppendorf (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo; USA) de 1.8 ml de capacidad. Luego se determinó su densidad celular y a cada tubo se le agregaron 500 µl de SDS al 0.4 y 1% respectivamente. Se incubaron a temperatura de laboratorio durante 10 min y se determinó el número y porcentaje de quistes resistentes a las diferentes concentraciones de SDS con respecto a la densidad celular inicial. Se calculó el promedio y desviación estándar de tales valores.

3.7 Selección de una cepa de *E. histolytica* capaz de enquistarse

Se colocaron 1×10^3 trofozoítos/ml en tubos de cultivo de 16 x 125 mm que contenían 11 ml de medio PEHPS de la cepa de *E. histolytica* HM-1 IMSS. Se incubaron a 37 °C durante 14 días. Estos tubos se centrifugaron a 700 g por 15 min. El medio de cultivo se aspiró enseguida por succión con la ayuda de vacío y en condiciones de esterilidad. Se

agregaron a cada tubo 9 ml de agua bidestilada estéril y se mantuvieron en refrigeración a 4°C por 24 h. Luego el medio hipotónico se aspiró y se agregó medio PEHPS recién preparado. Se incubaron de nuevo los tubos a 37°C y se observaron al microscopio invertido cada 24 h buscando la presencia de trofozoítos.

3.8 Influencia del LCR y del PACSR sobre el enquistamiento

15 tubos conteniendo medio PEHPS con trofozoítos en fase de crecimiento logarítmico se dividieron en tres grupos; los trofozoítos del primer grupo se inocularon en medio ME10, los del segundo grupo se inocularon en medio ME10 + LCR, y los del tercer grupo en ME10 sin suero, sino con el sustituto de suero PACSR. Los tubos de todos los grupos se incubaron durante 7 días a 37°C. Luego se cosechó y se evaluó la calidad global de los quistes.

3.9 Evaluación de la calidad biológica de los quistes

3.9.1 La calidad biológica.

Para evaluar la calidad biológica de los quistes se consideraron 5 factores de calidad.

A) Resistencia al sarcosyl al 0.1%.

Los quistes recién cosechados y suspendidos en 500 µl de agua bidestilada, se inocularon en tubos Eppendorf (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo; USA) de 1.8 ml de capacidad. Luego se determinó su densidad celular y a cada tubo se le agregaron 500 µl de Sarcosyl al 0.2%. Se incubaron a temperatura de laboratorio durante 10 min

y se determinó el porcentaje de quistes resistentes a Sarcosyl al 0.2% con respecto a la densidad celular inicial. Solamente a los quistes resistentes a Sarcosyl se les evaluaron los siguientes parámetros.

B) Aspecto celular normal.

Con la ayuda de un microscopio de luz (Axiophot) con técnica de campo claro. Se contaron 100 células de una preparación en fresco. Se calculó el porcentaje de células con apariencia microscópica redondeada, con citoplasma granular y con tamaño entre 6 y 12 μm con respecto al total de células contadas. Los resultados se reportaron como porcentaje de quistes con morfología normal con respecto al total de células contadas. Se consideró como quistes con morfología normal a aquellos con tamaño entre 6 y 14 μm , con citoplasma granular y con vesículas escasas en número y tamaño (Said Fernández y cols 1993).

C) Presencia de superficie celular gruesa y refringente.

En el mismo microscopio utilizando técnicas de campo claro y contraste de fases. Se contaron 100 células de una preparación en fresco. Se calculó el porcentaje de células con superficie celular lisa y refringente con respecto al total de células contadas.

D) Refringencia.

Ahora utilizando técnica de contraste de fases. Se contaron 100 células de una preparación en fresco. Se calculó el porcentaje de quistes refringentes con respecto al total de células contadas.

E) Núcleo

Una alícuota de 100 μ l de la suspensión de quistes se mezcló con 100 μ l de colorante de Hoescht. Se incubó durante 10 minutos en la oscuridad a temperatura de laboratorio. Enseguida, utilizando microscopio Axiophot se contaron 100 quistes con técnica de fluorescencia, y se determinó el porcentaje de quistes con uno o más núcleos con respecto al total de quistes contados.

3.9.2. La calidad global (CG).

Se expresó como la media geométrica de los porcentajes de quistes que cumplieron con los parámetros de calidad biológica mencionados .

$$CG = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n R_i}$$

Lo cual es el resultado de multiplicar los porcentajes de quistes que cumplen con cada

parámetro de calidad biológica $\prod_{i=1}^n R_i$ y luego calcular la raíz “n” de ese producto.

Donde n = 5.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.9.3. La calidad global relativa (CGR).

Es el producto de dividir la calidad global de los quistes producidos en el medio en estudio (CG_e) entre la calidad global de los quistes producidos en el medio testigo (CG_t).

$$CGR = \frac{CG_e}{CG_t}$$

3.10.. Optimización de un Medio por el Método Simplex

3.10.1. El método Simplex modificado para múltiples variables y múltiples respuestas.

Es un modelo matemático que permite evaluar las interacciones de varios factores de manera simultánea sobre una determinada respuesta. La cual a su vez es el resultado de conjuntar varias respuestas en una. Con este método se optimaron los valores y concentraciones de 11 factores químicos y 4 factores fisicoquímicos para alcanzar la mejor calidad global de los quistes de *E. histolytica* en condiciones axénicas. Para fines prácticos este análisis lo dividimos en dos fases. Durante la primera fase se optimaron las concentraciones de Suero bovino , glucosa , LCR , extracto de hígado y páncreas, mezcla de vitaminas 109 de Diamond, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , B^{3+} y durante la segunda fase se optimaron los valores de pH, osmolaridad, temperatura, potencial de óxido reducción y la concentración de fosfatos.

El método Simplex Sugiere iniciar los experimentos con $k+1$ pruebas (donde K es el número de variables a estudiar). Para la fase uno de optimación se planteó la siguiente matriz

inicial:

No. de medio
de enquistamiento

Factores a,b,c

	Suero B.	LCR	Glucosa	Boro	CaCl ₂	MgCl ₂	MnCl ₂	CoCl ₂	EHP	Vit.
1	baja	baja	baja	baja	alta	baja	baja	baja	baja	alta
2	baja	baja	baja	alta	baja	baja	alta	alta	alta	alta
3	baja	baja	alta	baja	baja	alta	baja	alta	alta	alta
4	baja	baja	alta	alta	alta	alta	alta	baja	baja	alta
5	baja	alta	baja	baja	baja	alta	alta	alta	baja	baja
6	baja	alta	baja	alta	alta	alta	baja	baja	alta	baja
7	baja	alta	alta	baja	alta	baja	alta	baja	alta	baja
8	baja	alta	alta	alta	baja	baja	baja	alta	baja	baja
9	alta	baja	baja	baja	baja	alta	alta	baja	alta	baja
10	alta	baja	baja	alta	alta	alta	baja	alta	baja	baja
11	alta	baja	alta	baja	alta	baja	alta	alta	baja	baja

a Ver tabla de factores y límites de concentración

b Baja, límite inferior de concentración de cada factor

c Alta, límite superior de concentración de cada factor

Los límites de concentración iniciales de los factores analizados durante esta primera

fase fueron los mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Límites iniciales de concentraciones de factores durante la fase 1 de optimación.

Factor	Límites de concentración	
	Inferior	Superior
1.- Suero bovino	0	8%
2.-LCR	0	1%
3.-Glucosa	0	33 mM
4.-Tetraborato de sodio	0	4 mM
5.- Cloruro de calcio	0	4 mM
6.-Cloruro de magnesio	1	4 mM
7.- Cloruro de manganeso	1	10 mM
8.- Cloruro de cobalto	1	10 mM
9.- Extracto de hígado y páncreas	0	250 ml /L medio
10.- Mezcla de vitaminas 109 Diamond	0	0.5% (v/v)

Para la segunda fase de optimación se decidió utilizar la matriz inicial como la

sugiere el método Simplex la cual es la siguiente:

Medio	Factores ^{a,b,c}				
	pH	Temperatura	Potencial ^d	Osmolaridad	Fosfatos ^e
A	baja	baja	baja	baja	alta
B	baja	baja	alta	alta	alta
C	baja	alta	baja	alta	baja
D	baja	alta	alta	baja	baja
E	alta	baja	baja	alta	baja
F	alta	baja	alta	baja	baja

a Ver tabla de factores y límites de concentración

b Baja, límite inferior de concentración de cada factor

c Alta, límite superior de concentración de cada factor

d Potencial de óxido reducción

e Concentración mM de fosfato de potasio monobásico y fosfato de sodio dibásico

Las concentraciones y valores iniciales superior e inferior para cada factor en esta segunda fase de optimación del medio se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones y valores iniciales de cada factor analizado durante la fase 2 de optimación

Factores	Concentraciones y valores	
	inferior	superior
1.- pH	5.3	6.55
2.- Temperatura	25°C	40°C
3.- Potencial de óxido reducción	+80	+185
4.- Osmolaridad	200 mOsm/Kg	330 mOsm/Kg
5.- Concentración mM de fosfatos ^a	0 mM	66 mM

^a Fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio monobásico.

Los medios diseñados con la ayuda de la matriz inicial, se utilizaron para inducir el enquistamiento de trofozoítos en fase de crecimiento logarítmico contenidos en tubos de borosilicato con medio PEHPS. Estos tubos se incubaron durante 7 días a 37°C. Los quistes se cosecharon y se les evaluó la calidad global relativa como ya se mencionó. Posteriormente

los medios se ordenaron del mejor al peor de acuerdo a la calidad global relativa de los quistes producidos en ellos.

Para determinar cuántos de los medios se eliminarían, primero los medios se agruparon de la siguiente manera: en el primer grupo se separó solo el medio con el mejor resultado que se consideró como “el mejor” y el resto de los medios como “los peores”, en el segundo grupo los dos medios con mejores resultados se consideran como “los mejores” y el resto de los medios como “los peores” y así sucesivamente hasta separar los mejores medios y solo dejar “el peor”. Se calculó la diferencia del resultado de “el mejor medio” con el promedio de “los peores medios”. Luego se calculó la diferencia del promedio de los resultados de los 2 mejores medios con el promedio de los restantes y así sucesivamente hasta calcular la diferencia existente entre el promedio de los resultados de “los mejores medios” con el resultado de “el peor medio”. Una vez calculadas las diferencias entre los resultados de “los peores” y “mejores” medios, se escogió el grupo con la mayor diferencia. Del grupo seleccionado se conservaron “los mejores” o “el mejor” medio y se eliminaron “los peores” o “el peor” medio. Enseguida se diseñó una nueva matriz, donde los nuevos medios sustituyeron a los peores recién eliminados.

La forma en que se diseñaron nuevos medios en esta etapa, fue sustituyendo los valores y concentraciones de cada factor en el medio eliminado con la ayuda de una fórmula matemática simple:

Nueva concentración de factor a probar = $2C$ mejores - peor.

Donde $2C$ mejores = dos veces la media de la concentración o valor del factor en los mejores medios evaluados en la etapa previa y peor = es la concentración o valor del factor en el

medio eliminado. Esto se repite para cada factor en cada medio eliminado hasta sustituirlos a todos.

Los nuevos medios se probaron buscando mejorar la calidad global de los quistes. Después de cosechar y evaluar la calidad. Los resultados se ordenaron de nuevo del mejor al peor. Se eliminaron los peores medios del mismo modo como se había realizado en la etapa previa.

Para el diseño de nuevos medios durante esta etapa se utilizaron diferentes fórmulas de acuerdo a los resultados de los medios eliminados. Si el resultado del medio eliminado fue menor que el peor resultado previo se realiza una expansión:

$$\text{Nueva concentración de factor a probar} = C + 0.5(C + P)$$

donde C = mejor + intermedio.

2

P = el resultado del medio eliminado

Si los resultados de los medios a eliminar fueron menores a los del medio con resultado intermedio pero mayor que los del peor medio previo, entonces se realizó una contracción R:

$$\text{Nueva concentración de factor a probar} = C + 0.5(C - P)$$

Si los resultados del medio a eliminar son superiores al del grupo intermedio pero menores que el mejor, se realizó una contracción:

$$\text{Nueva concentración de factor a probar} = C - 0.5(C - P).$$

Finalmente si el medio a eliminar fue superior al mejor medio previo se utiliza una reflexión simple 2C-P. Estas mismas fórmulas se aplicaron para las etapas posteriores de optimación por el método Simplex.

La optimación se dió por terminada cuando no se logró mejorar más la calidad global y las concentraciones y valores de los factores se circunscribieron a un área determinada.

Todos estos pasos se siguieron durante las 2 fases de la optimación por el método Simplex.

3.10.2 Preparación de los medios de enquistamiento durante la optimación.

Para la preparación de los medios durante la fase 1 se agregaron 6 ml de solución basal o medio basal en tubos de borosilicato con tapón de rosca. Se esterilizó en autoclave con los tapones flojos durante 15 min a 121°C. Inmediatamente después de esterilizar se apretaron los tapones. Luego bajo condiciones de esterilidad, se agregaron de 0 a 1 ml de suero, 0.5 ml de SSE 24x y de 0 a 1 ml de concentraciones variables de CaCl₂, Glucosa, Tetraborato de Sodio, MgCl₂, MnCl₂ y CoCl₂, concentrados siempre 12x para alcanzar la concentración deseada en el medio. El volumen de LCR varió entre 0 y 0.1 ml La mezcla de vitaminas # 109 de Diamond varió entre 0 y 30 µl. Las diferentes concentraciones de EHP variaron desde 0 en la solución basal de enquistamiento al 25% en el medio basal. Cuando cualquier otro factor requería de una concentración cero, su volumen se sustituía con agua bidestilada. La osmolaridad final se ajustó con volúmenes variables de cloruro de sodio 2.16 M. El volumen final del medio de enquistamiento en los tubos de cultivo se aforó a 12.5 ml con agua bidestilada.

Para la preparación de los medios durante la fase 2 se agregaron 6 ml de solución basal en tubos de borosilicato con tapón de rosca. Se esterilizó en autoclave con los tapones flojos durante 15 min a 121°C. Inmediatamente después de esterilizar se apretaron los tapones. Luego bajo condiciones de esterilidad, se agregaron 1 ml de suero, 0.5 ml de SSE 24x y de 0.5 ml de CaCl₂, Glucosa, Tetraborato de Sodio, MgCl₂, MnCl₂ y CoCl₂, concentrados siempre 24x para alcanzar la concentración deseada en el medio. Los diferentes valores de pH se alcanzaron modificando las proporciones del fosfato dibásico de sodio y fosfato monobásico de potasio incluidos en el medio de acuerdo a lo recomendado por las tablas científicas buffer de fosfatos de Sorensen. Para modular el valor de la temperatura de incubación se utilizaron diferentes incubadoras simultáneamente con diferentes temperaturas de incubación, pero nunca más de tres. Para modificar el potencial de oxido reducción se utilizó Manitol 5 mM . Para modificar la osmolaridad se utilizó NaCl 2.16 M en diferentes volúmenes y finalmente la concentración de fosfatos se modificó solo en la preparación de la solución madre la cual siempre se concentró 24x y se agregaron 0.5 ml para alcanzar la concentración final adecuada en el medio.

3.11 Método para evaluar la influencia del H₂O₂ sobre el enquistamiento

3.11.1. Preparación de medios con H₂O₂ :

A 18 tubos de cultivo conteniendo 6 ml de solución de Peptona se les agregaron las mismas concentraciones de factores que en los mejores medios diseñados utilizando el método Simplex. A estos tubos se les agregaron 0.5 ml de H₂O₂ 0, 0.27, 0.54, 0.81, 1.08y 1.35 mM concentrados 24x. Se probó su capacidad para inducir el enquistamiento, inoculando en ellos trofozoítos en fase de crecimiento logarítmico. Se incubaron durante 7

días a 37°C. Los quistes producidos en estos medios se cosecharon y se les evaluó la calidad global con respecto al testigo y con respecto a los medios diseñados previamente.

3.12 Método para determinar la influencia del sedimento sobre el enquistamiento

3.12.1. Preparación de los medios de enquistamiento con y sin sedimento.

Algunos de los medios de cultivo desarrollados para inducir el enquistamiento son bifásicos, a estos medios se les aspiró el sobrenadante y se probó la capacidad de el sobrenadante de inducir el enquistamiento del mismo modo como se realizó con los medios bifásicos. Los ensayos se realizaron por triplicado y se calculó el promedio y desviación estándar de la calidad global. La calidad global de los quistes producidos en los sobrenadantes se comparó con la producida en los medios bifásicos.

3.13. Preparación de los quistes para microscopía electrónica

Se realizó un ensayo con 25 tubos de cultivo separados en grupos de cinco tubos. Todos los grupos se inocularon con 1000 trofozoítos por ml y se incubaron a 37°C en medio PEHPS. El primer grupo se cosechó a los 4 días enfriando los tubos en agua hielo durante 15 min y centrifugando 700 g por 15 min, aspirando el medio y enjuagando en dos ocasiones con PBS. El segundo grupo se cosechó a los 14 días de incubación. Estos tubos se centrifugaron a 700 g por 15 min. Se aspiró el medio y se enjuagó en dos ocasiones con PBS. En el resto de los grupos se indujo el enquistamiento con los medios diseñados donde se produjo la mejor calidad global. Estos tubos se centrifugaron a 700 g por 15 min. Se aspiró el medio y se enjuagó en dos ocasiones con PBS.

Una vez obtenidas las muestras, se centrifugaron de nuevo y se retiró el sobrenadante, el sedimento se recogió con una pipeta Pasteur y se vació en tubos Eppendorf (Sigma

Chemical Co. St. Louis, Mo; USA) de 1.8 ml de capacidad resuspendiéndose en glutaraldeído al 2.5%. Se incubó una hora a 37°C y luego se centrifugó a 700 g y se enjuagó en dos ocasiones con buffer de Cacodilatos pH 7.4. Las muestras procesadas se guardaron en refrigeración hasta su envío al laboratorio de microscopía electrónica.

3.14. Método para determinar la capacidad de desenquistarse *in vitro* de los quistes formados en medio de enquistamiento

Se realizó un ensayo en 90 tubos de cultivo con medio PEHPS los tubos se inocularon con 1000 trofozoítos por ml y se incubaron a 37°C durante 4 días. Luego los trofozoítos se inocularon en el medio de enquistamiento donde se produjeron los quistes con mejor calidad global (21p10). Los tubos se dividieron en tres grupos. A los tubos del primer grupo se les aspiró el medio de cultivo y se cambió por agua bidestilada. Al segundo grupo se aspiró el medio y se le cambió por 2 ml de ácido clorhídrico pH 2 y se incubó durante 15 minutos. Luego se centrifugó a 700 g por 15 min, se aspiró el ácido y se cambió por agua bidestilada. Al tercer grupo se le aspiró el medio y se agregaron 2.5 unidades de quitinasa y 10 mg de tripsina disueltos en 2ml de PBS pH 6. Se incubó a temperatura de laboratorio durante 30 min. Luego se centrifugó a 700 g por 15 min, se aspiró y se cambió por agua bidestilada.

Los quistes de todos los grupos suspendidos en agua bidestilada se incubaron durante 24 horas a 4°C. Luego se centrifugaron y se cambió el agua por medio PEHPS fresco e incubándose a 37°C. Los tubos de cultivo se observaron al microscopio invertido cada 24 horas buscando la presencia de trofozoítos.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Estandarización de los medios de cultivo

4.1.1 Curva de crecimiento de trofozoítos de *E. histolytica*.

Los cultivos con trofozoítos inoculados en medio PEHPS e incubados a 37°C mostraron una curva de crecimiento donde no se observó fase lag, la fase de crecimiento logarítmico se observó de las 48 a las 96 h y una fase estacionaria después de las 96 h (Fig. 1).

Trofozoítos/ml ($\times 10^3$)

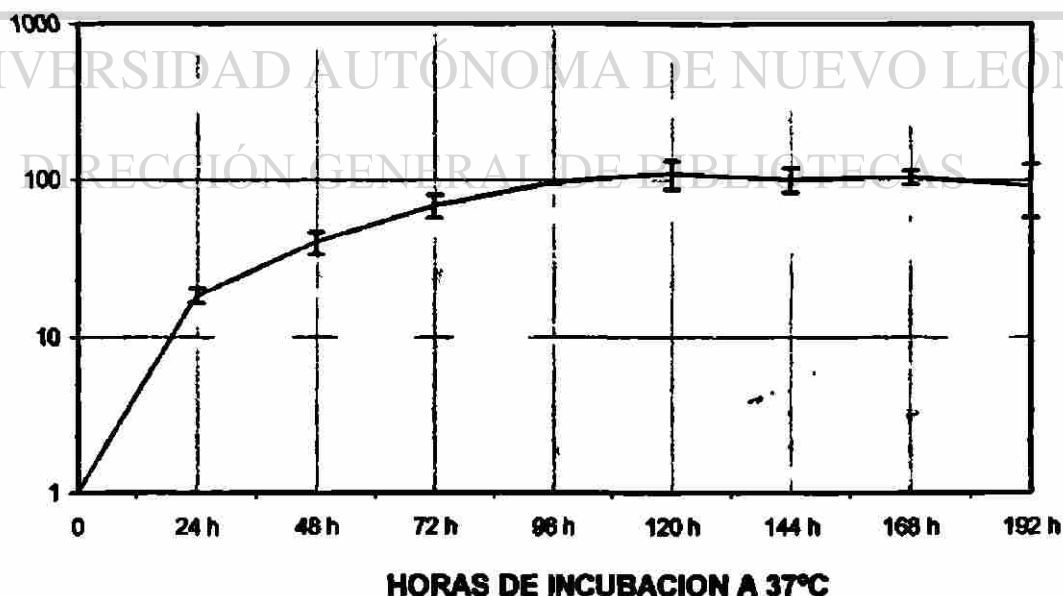


Figura 1.- Curva de crecimiento de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. Se inocularon 1000 trofozoítos/ml en tubos de borosilicato con tapón de rosca conteniendo medio PEHPS y se determinó la densidad celular, cada 24 h, con hematocitómetro. Promedio de tres ensayos \pm error estándar.

4.1.2. Determinación del tiempo óptimo de producción de ESQR resistentes al efecto de SDS al 0.4 y 1%.

La producción de ESQR resistentes al efecto de detergentes se inició al cuarto día y alcanzó el mejor rendimiento al octavo después de haberse inducido el enquistamiento. Las ESQR producidas fueron más resistentes al efecto de SDS al 0.4 que al 1%. La proporción de ESQR resistentes al efecto de SDS al 0.4% fue 3 veces superior al de las ESQR que resistieron el efecto del SDS al 1% (Fig. 2).

Número de quistes resistentes a ($\times 10^3$)

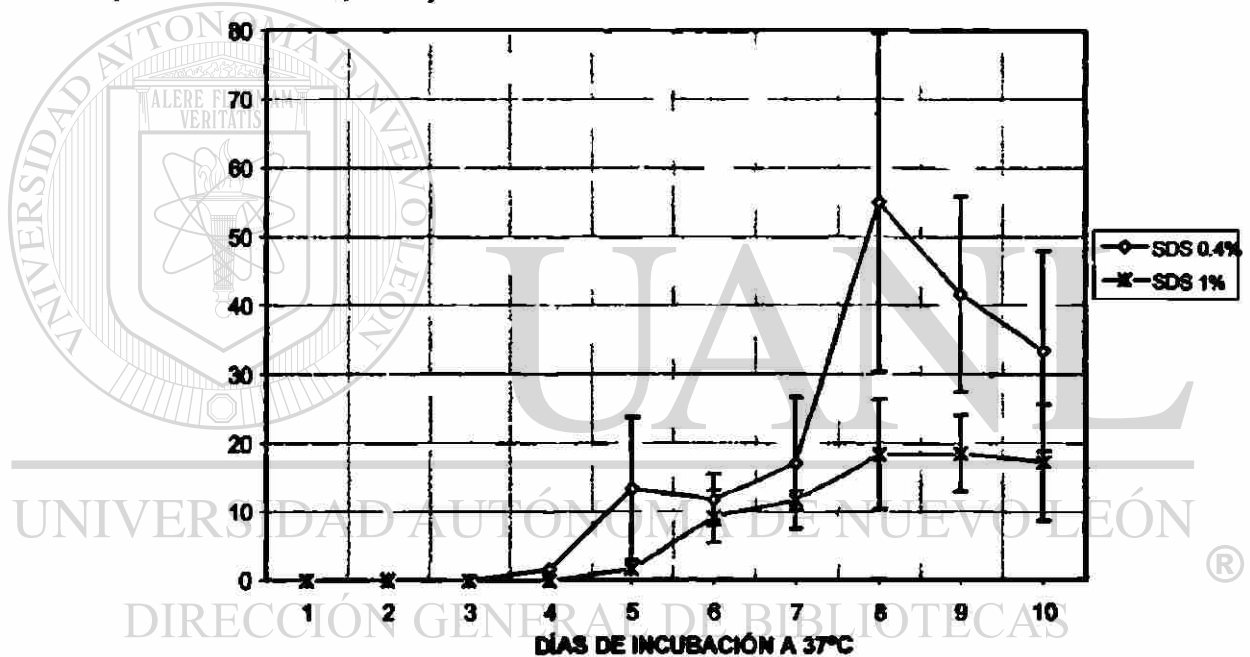


Figura 2.- Relación temporal de formación de ESQR resistentes a SDS. Se inocularon 2.27×10^6 trofozoítos en fase de crecimiento logarítmico en 12 ml de ME 20 (PEHPS + $MgCl_2$ 1.22 mM, $MnCl_2$ 14.44 mM, $CoCl_2$ 19.44 mM). El rendimiento total de amibas (trofozoítos, quistes, pre-quistes) al octavo día fue de 32% en relación al inóculo (0.71×10^6). Después de cosechar, contar las amibas y someterlas dos veces a choque hiposmótico con agua bidestilada durante 10 min, estas se incubaron por 5 min en SDS al 0.4% ó 1% inmediatamente después se contaron las ESQR intactas. Promedios de tres ensayos \pm error estándar.

4.2. Selección de una cepa de *E. histolytica* capaz de enquistarse

Se observó la presencia de trofozoítos en los tubos de cultivo después de 72 horas de incubados de nuevo a 37°C en medio PEHPS recién preparado. En cinco de los tubos, los

trofozoítos crecieron hasta alcanzar a llenar los tubos de cultivo. De estos tubos se seleccionó el que contenía los trofozoítos con la mejor apariencia. A partir de este tubo se continuó resemebrando cada 96 h para utilizar esta sub-cepa durante el resto del desarrollo de este trabajo.

4.3. Determinación de la influencia del LCR y el PACSR sobre el enquistamiento

Los quistes producidos en el medio de enquistamiento testigo conteniendo únicamente suero bovino fueron los de mejor calidad global. El enquistamiento ocurrió en presencia de LCR formándose quistes con calidad global 1.26 veces superior a los producidos en medio de enquistamiento conteniendo el sustituto de suero para el cultivo axénico de protozoarios (PACSR) (Tabla 4).

Tabla 4.- Influencia del LCR y PACSR sobre la calidad global de los quistes de *E. histolytica* formados en medio 10^a en condiciones axénicas.

FACTOR DE CALIDAD	PORCENTAJE DE QUISTES ^b		
	Suero ^c	Suero + LCR ^d	PACSR ^e
Resistencia a Sarcosyl 0.1%	95.5%	92%	100%
Birrefringencia	52%	30%	69%
Pared y citoplasma normal	26%	23%	16%
Núcleos íntegros	34%	28%	7%
Morfología normal	32%	26%	19%
CALIDAD GLOBAL^f	42.5%	34%	27.1%

^a Medio PEHPS adicionado con MgCl₂ 4 mM, MnCl₂ 10 mM y CoCl₂ 10 mM

^b Quistes que reunieron los criterios de cada factor de calidad con respecto al total de quistes formados (2.55 x 10⁶ promedio).

^c 8% de suero bovino.

^d 8% de suero bovino más 0.8% de un preparado comercial rico en lípidos y colesterol.

^e 8% del sustituto de suero para el cultivo axénico de protozoarios.

^f Media geométrica de los porcentajes de los 5 factores de calidad mencionados.

4.4. Incremento de la calidad biológica de los quistes

4.4.1. Incremento de la calidad global relativa durante la fase 1 de optimación.

Durante la primera fase de optimación de la calidad global relativa de los quistes producidos en un medio de enquistamiento utilizando el método Simplex, se diseñaron y probaron 25 medios de enquistamiento. El medio utilizado como testigo fue el medio 11. Con

calidad global de 0.5474 y calidad global relativa 1.0. La peor calidad global relativa se observó en los quistes formados en el medio 5 con un valor de 0.3158. Mientras la mejor calidad global relativa se encontró en el medio 21 con un valor de 1.11. La calidad global relativa de los quistes se incrementó 3.51 veces durante esta fase cuando se comparó la calidad de los quistes formados en el mejor medio de enquistamiento con respecto a la calidad de los quistes en el peor medio. En la Fig.3 se observa como en las primeras 2 etapas la calidad global relativa se incrementó con respecto al medio que produjo los peores resultados. Mientras en las etapas finales no hubo incremento en la calidad global relativa, los factores en estudio durante esta fase modificaron sus concentraciones en un rango cada vez más reducido (Fig.5). Por estos motivos se dió por concluida esta fase de optimación.

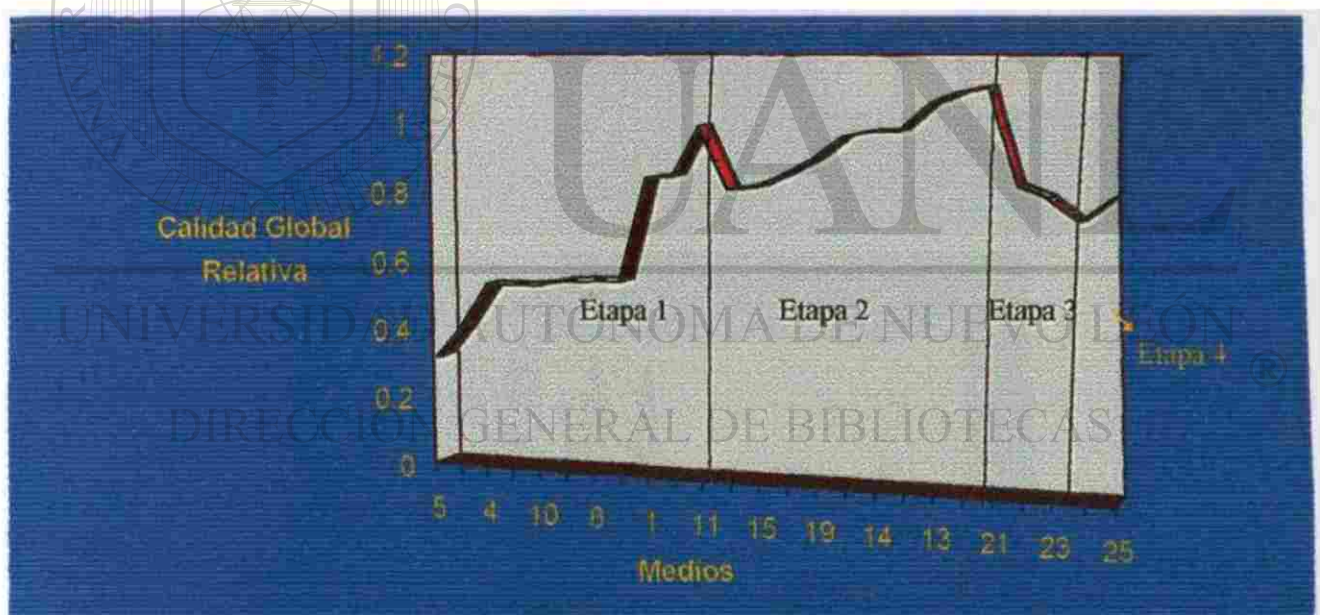


Figura 3.- Incremento de la calidad global relativa de los quistes de *E. histolytica* por efecto de diez factores químicos (fase I). Con ayuda del método Simplex, modificado para múltiples variables y múltiples respuestas se diseñaron y probaron 25 medios de enquistamiento. Se analizó el efecto de concentraciones variables de los siguientes factores: Suero bovino, glucosa, LCR, extracto de hígado y páncreas, mezcla de vitaminas 109 de Diamond, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , B^{3+} . Se inocularon tres tubos con 1.7×10^5 trofozoítos/ml en fase de crecimiento logarítmico en el medio de enquistamiento y se incubaron durante 7 días a $37^{\circ}C$. A los quistes así producidos se les evaluó la calidad global relativa, la cual se expresó como la media geométrica de los porcentajes de quistes con los siguientes indicadores de calidad: pared bien definida y citoplasma normal, resistencia a Sarcosyl al 0.1%, birrefringencia, núcleos y morfología normal, entre la calidad global del medio testigo (11). Los resultados se presentan ordenados por etapas y del peor al mejor medio diseñado dentro de cada etapa.

4.4.2. Determinación de factores no esenciales para el enquistamiento de *E. histolytica*

El método Simplex permitió eliminar factores que no influyen sobre el resultado esperado. Para esta primera fase de optimación fue posible eliminar las vitaminas, el extracto de hígado y páncreas y LCR. En la Fig.4 se observa que las concentraciones de los factores mencionados oscilaron entre la máxima concentración diseñada y cero, con tendencia siempre a disminuir y finalmente estos factores no se requirieron en el medio donde se formaron los quistes de mejor calidad global.

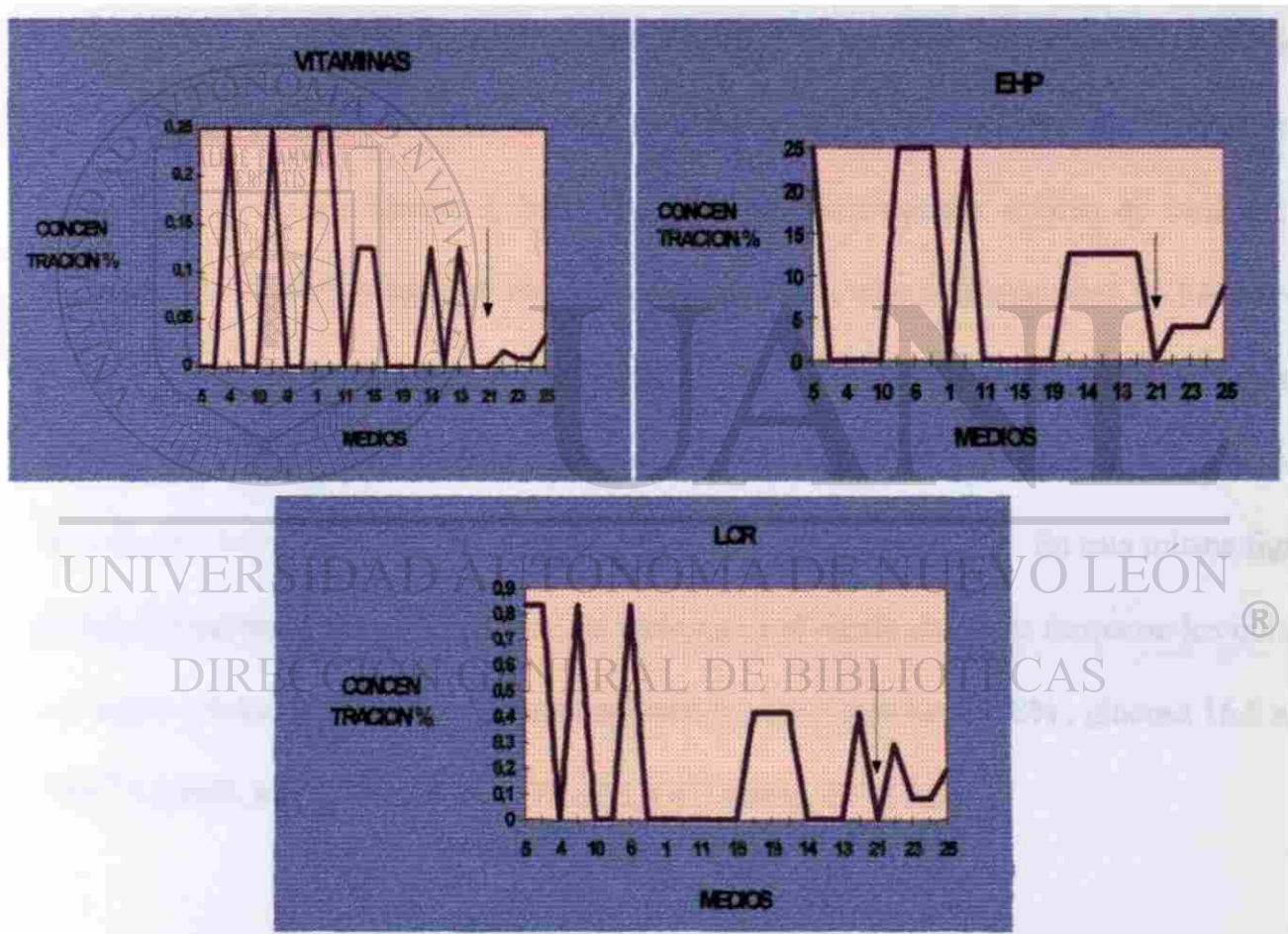


Figura 4.- Identificación de factores no esenciales para el enquistamiento de *E. histolytica*. Se analizó el efecto de concentraciones variables de: Suero bovino , glucosa , preparado comercial rico en lípidos y colesterol (LCR) , extracto de hígado y páncreas (EHP), mezcla de vitaminas 107 de Diamond, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , B^{3+} . Obsérvese en la Fig.3 que la mejor calidad de los quistes se obtuvo en el medio 21 (La flecha indica la concentración que tenía el factor analizado en el medio 21). Nótese que en este medio no se incluyeron vitaminas, EHP ni LCR. Las concentraciones de los factores mencionados en esta figura oscilaron entre el máximo valor permitido y cero. Pero la mejor calidad de los quistes se observó en el medio en donde no se incluyeron los factores mencionados.

4.4.3. Optimización de las concentraciones de los factores que influyen en el enquistamiento de *E. histolytica*.

Las concentraciones de varios factores como Suero bovino, glucosa, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} y B^{3+} se pudieron optimar después de las 4 etapas mencionadas en la Fig. 3. Se puede observar en la Fig. 5 que las concentraciones de los factores oscilaron en un amplio intervalo desde la mínima hasta la máxima concentración inicialmente diseñadas y conforme avanzaron las etapas propuestas por el método Simplex, las concentraciones de los factores en estudio se limitaron a un intervalo cada vez menor, algunos con tendencia a disminuir y otros con tendencia a aumentar, hasta encontrar la concentración óptima de cada factor donde se produjeron los mejores resultados, coincidiendo con la incapacidad de los nuevos medios diseñados de producir quistes con calidad global superior a la de los quistes formados en el medio con la mejor combinación de factores desarrollado hasta ese momento.

Por estos motivos se decidió dar por concluida esta fase de optimación. En esta misma figura pudimos observar la concentración de los factores en el medio donde se formaron los quistes con mejor calidad global. Estas concentraciones fueron: suero bovino 8% , glucosa 16.6 mM , Mg^{2+} 1.5 mM, Mn^{2+} 5.5 mM, Co^{2+} 10 mM, Ca^{2+} 4 mM, B^{3+} 2 mM.

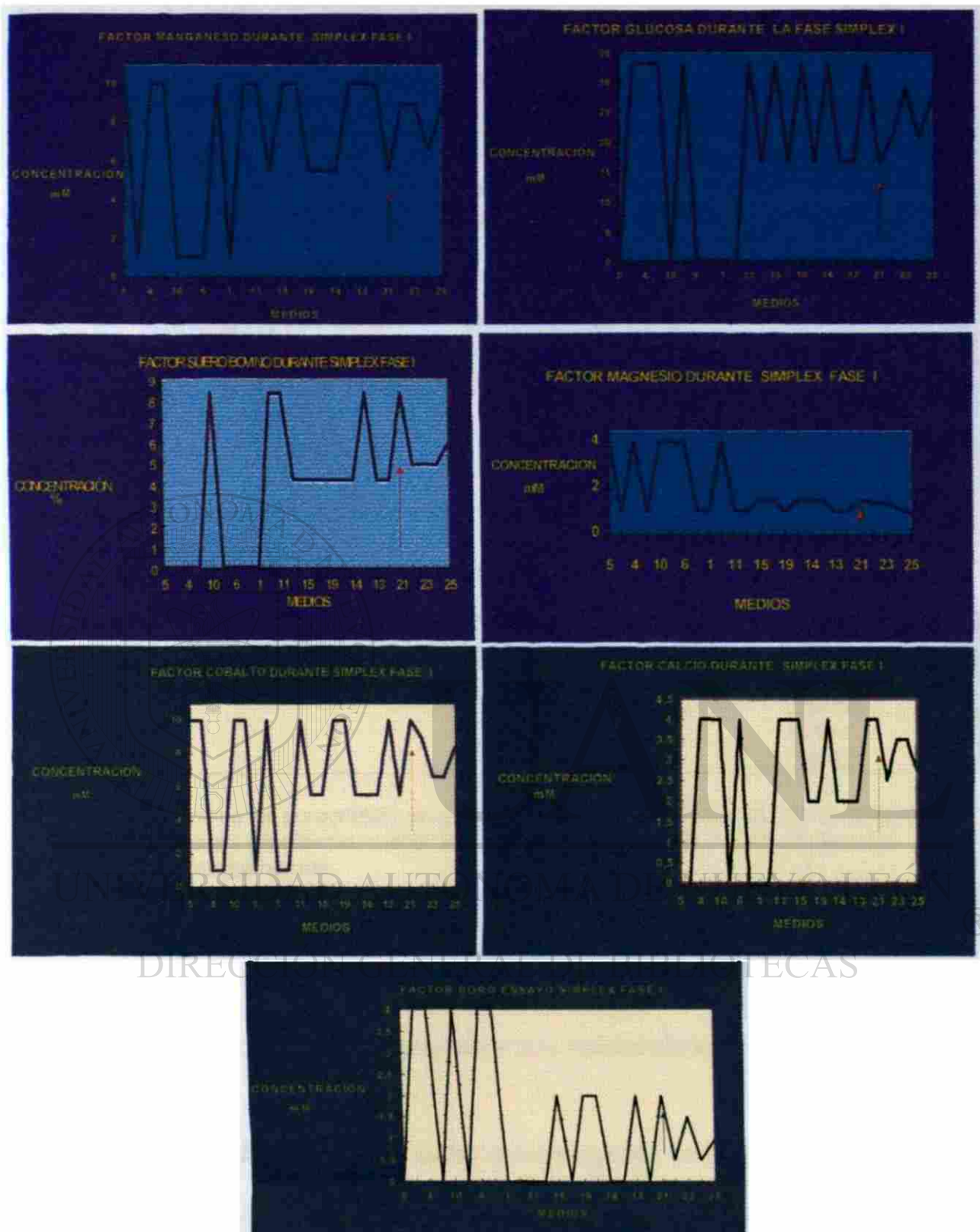


Figura 5.- Identificación de los factores esenciales para el enquistamiento y determinación de la concentración en la que se producen los quistes de mejor calidad global (medio 21). Obsérvese que las concentraciones de los factores mencionados en esta figura oscilaron inicialmente entre el máximo valor y el menor, luego las variaciones en concentración disminuyeron y finalmente se encontró la concentración donde se alcanzó la mejor calidad global relativa (medio 21) (La flecha indica la concentración que tenía el factor analizado en el medio 21). Suero bovino 8% , glucosa 16.6 mM , Mg^{2+} 1.5 mM, Mn^{2+} 5.5 mM, Co^{2+} 10 mM, Ca^{2+} 4 mM, B^{3+} 2 mM. Variaciones posteriores en la concentración de estos factores no resultaron en un incremento en la calidad global de los quistes producidos.

4.4.4. Comparación de la calidad global de los quistes producidos en la fase 1 de optimización contra la calidad global de las ESQ formadas en medio PEHPS

Cuando se comparó la calidad global de los quistes formados en el peor, intermedio y mejor de los medios desarrollados durante esta fase, se observó que los quistes formados en el mejor medio (21) alcanzaron una calidad global de 1.8 veces mayor en proporción a la calidad global de las ESQ formadas de manera espontánea en medio PEHPS. Mientras la calidad de los quistes formados en el peor medio (5) solo alcanzó un valor de 0.53 veces con respecto a la calidad global de estos mismos quistes (Tabla 5).

Tabla 5.- Fase 1. Incremento en calidad global de los quistes formados en diferentes medios.

Medio	Calidad global de los quistes	Calidad global relativa
PEHPS	0,3206	1
5	0,1723	0,5373
11	0,5474	1,7071
21	0,5776	1,8012

^a Media geométrica de los porcentajes de quistes con los siguientes indicadores de calidad: pared bien definida y citoplasma normal, resistencia a Sarcosyl al 0.1%, birrefringencia, núcleos y morfología normal.

^b Calidad global de los quistes formados en un medio entre la calidad global de las ESQ formadas en PEHPS.

4.4.5. Comparación de las diferentes concentraciones de los factores en los medios donde se formaron los quistes con mejor, intermedia y peor calidad global de los quistes.

Las principales diferencias en las concentraciones de los 10 factores analizados en esta fase fueron: En el peor medio sólo se incluyen Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y LCR. En el medio donde se produjeron los quistes con calidad intermedia se incluyeron además suero bovino, glucosa y Ca^{2+} y se eliminó el LCR. Finalmente en el mejor medio se delimitaron las concentraciones óptimas de los factores que influyeron positivamente sobre el

enquistamiento. Las concentraciones de los factores fueron: suero bovino 8% , glucosa 16.6 mM , Mg^{2+} 1.5 mM, Mn^{2+} 5.5 mM, Co^{2+} 10 mM, Ca^{2+} 4 mM, B^{3+} 2 mM. Sin vitaminas, extracto de hígado y páncreas ni LCR (Tabla 6).

Tabla 6.- Fase 1. Composición de los medios de enquistamiento con peor, intermedia y mejor calidad global.

Concentraciones	Medio		
	5 ^a	11 ^b	21 ^c
Suero Bovino	0%	8%	8%
Glucosa	0 mM	33 mM	16.6 mM
B^{3+}	0 mM	0 mM	2 mM
Ca^{2+}	0 mM	4 mM	4 mM
Mg^{2+}	4 mM	1 mM	1.5 mM
Mn^{2+}	10 mM	10 mM	5.5 mM
Co^{2+}	10 mM	10 mM	10 mM
EHP ^(d)	0%	0%	0%
Mezcla de Vitaminas 109	0%	0%	0%
LCR ^(e)	1%	0%	0%

^a Medio en que se produjeron los quistes de peor calidad.

^b Medio en que se produjeron quistes de calidad intermedia.

^c Medio en que se produjeron los quistes de mejor calidad.

^d Extracto de hígado y páncreas.

^e Preparado comercial rico en lípidos y colesterol.

4.4.6. Optimización de la calidad global de los quistes de *E. histolytica* durante la fase 2.

Para esta segunda fase se diseñaron y probaron 15 medios de enquistamiento donde se analizó el efecto de diferentes valores de temperatura, pH, osmolaridad, potencial de óxido-reducción y concentraciones variables de fosfatos. El medio utilizado como testigo fue el medio 21. Con un valor de calidad global de 0.5869 y calidad global relativa de 1.0. La peor calidad global relativa se observó en los quistes formados en el medio 21-A y fue de 0.0674. Mientras la mejor calidad global relativa se encontró en el medio 21-C con un valor de 1.20. La calidad global relativa de los quistes se incrementó 1.2 veces más durante esta fase. Se observó que durante la primera etapa se alcanzó la mejor calidad global relativa en el medio 21-C. Mientras en las etapas finales no hubo incremento (Fig.6).

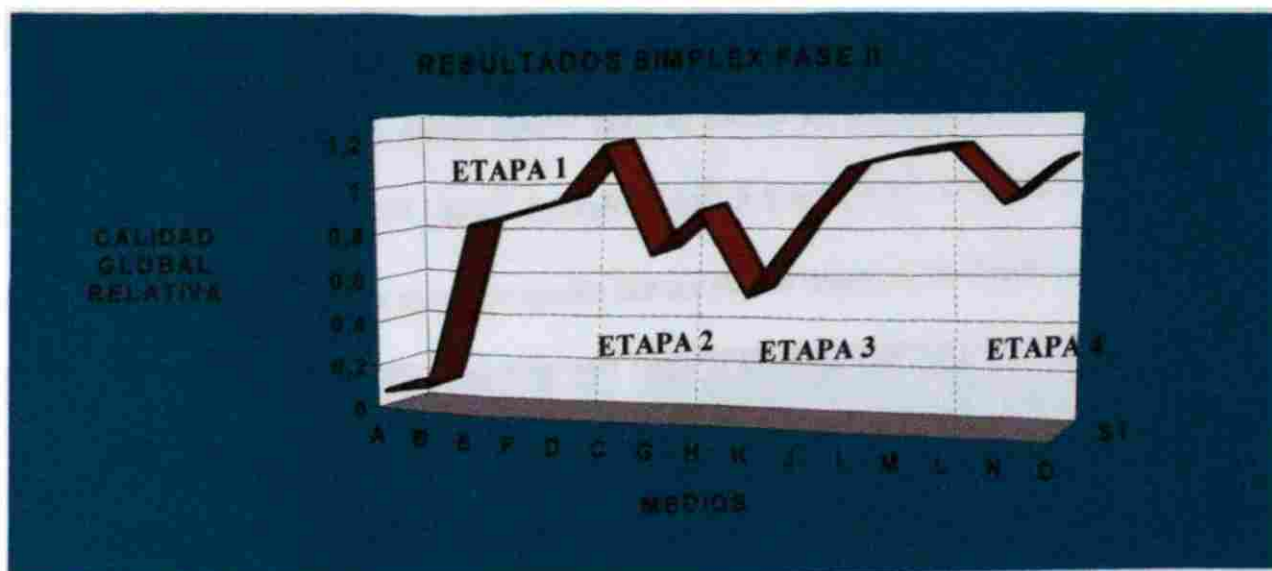


Figura 6.- Incremento de la calidad global relativa de los quistes de *E. histolytica* por efecto de cuatro factores fisicoquímicos y un factor químico. Para la fase II del presente estudio y con la ayuda del método Simplex, se diseñaron y probaron 15 medios de enquistamiento. Se analizó el efecto de condiciones variables de los siguientes factores: temperatura, pH, osmolaridad, potencial de óxido-reducción y concentraciones variables de fosfatos. Para realizar los análisis se siguió el mismo procedimiento que en la Fig.3 pero en esta fase del estudio se utilizó el medio 21 como testigo. Obsérvese que la mejor calidad global relativa de los quistes formados se obtuvo con el medio 21-C. Los resultados se presentan ordenados por etapas y del peor medio diseñado al mejor dentro de cada etapa.

4.4.7 Determinación de los valores y concentraciones óptimos de los factores durante la fase

2

Las concentraciones de fosfatos y los valores de temperatura, pH, osmolaridad, potencial de óxido-reducción se pudieron optimar después de las 4 etapas mencionadas en la Fig. 6. Se observa en la Fig. 7 que las concentraciones y valores iniciales de los factores durante la segunda fase de optimación oscilaron en un amplio intervalo y luego se limitaron a un intervalo cada vez menor y similar a los valores observados en el medio donde se produjeron los quistes con calidad global 1.2 veces superior al testigo. La calidad global no se incrementa en las fases finales. Motivo por el cual se decidió dar por finalizada esta fase de optimación. En la Fig. 7 también podemos observar que la concentración de fosfatos y los valores del resto de los factores en el medio donde se formaron los quistes con mejor calidad global. Estas concentraciones y valores fueron los siguientes: fosfatos 33 mM, pH 5.3,

temperatura 40°C, osmolaridad 365 mosm/kg y potencial de óxido reducción +130mv. Además de los factores ya mencionados para el medio 21 los cuales no variaron (suero bovino 8% , glucosa 16.6 mM , Mg^{2+} 1.5 mM, Mn^{2+} 5.5 mM, Co^{2+} 10 mM, Ca^{2+} 4 mM, B^{3+} 2 mM). Cabe mencionar que el mejor medio fue un medio bifásico. Es decir con sedimento.

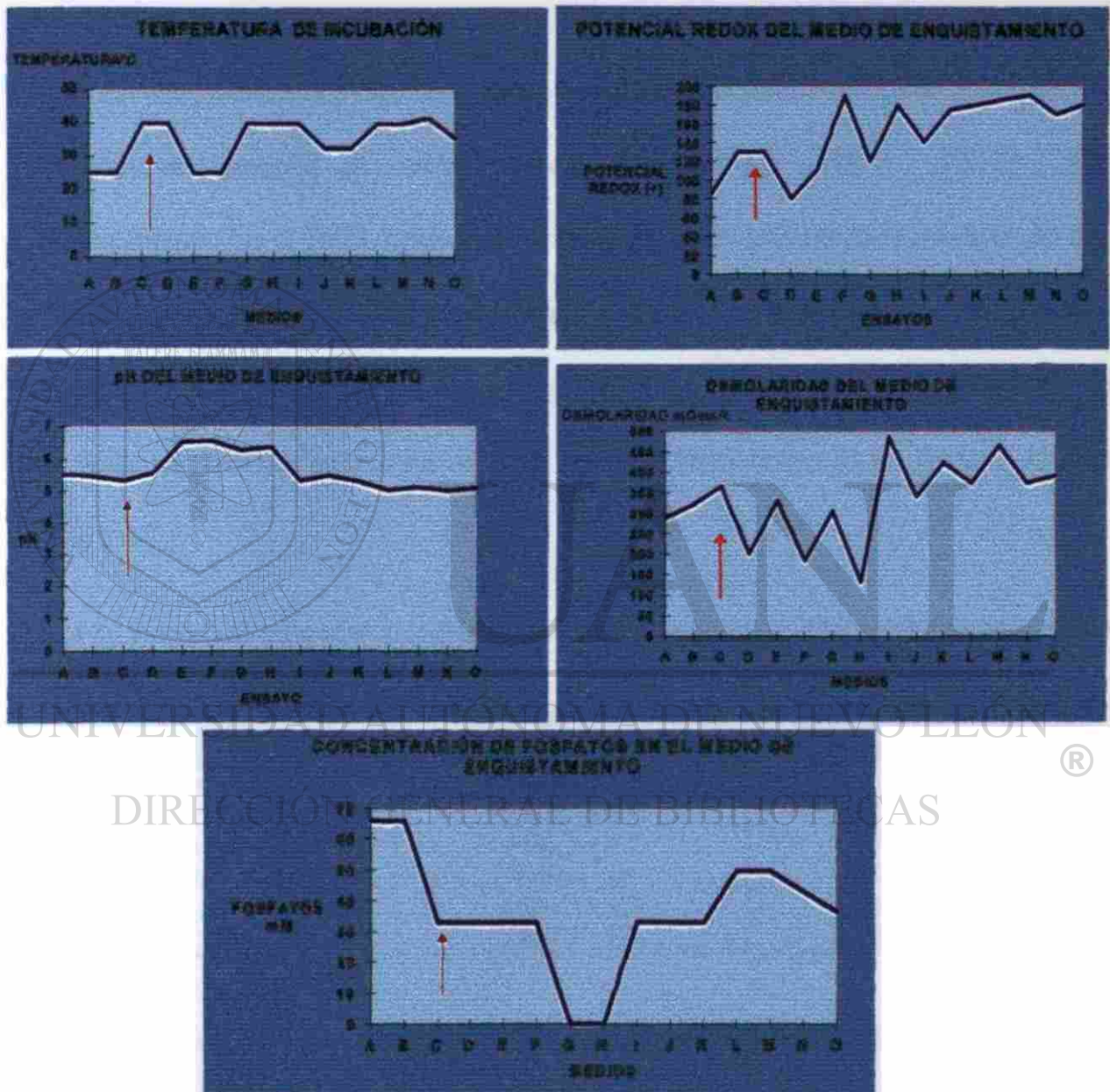


Figura 7.- Identificación y determinación de los valores y concentraciones óptimas de los factores de la fase II. En la Fig.6 se muestra que en el medio 21-C se produjeron los quistes con mejor calidad global. Obsérvese que las fluctuaciones en los valores de pH, osmolaridad, temperatura, potencial redox y las concentraciones de fosfatos en los medios de enquistamiento se limitaron en un área cercana a los valores donde se alcanzó la mejor calidad global (medio 21-C) (La flecha indica la concentración que tenía el factor analizado en el medio 21-C). Los valores de los factores fisicoquímicos observados en ese medio fueron pH 5.3, temperatura 40°C, potencial redox +130mv, osmolaridad 365 mosm/kg, y la concentración de fosfatos 33 mM.

4.5 Influencia del H₂O₂ sobre el enquistamiento.

4.5.1 Determinación de la influencia de diferentes concentraciones molares de H₂O₂ sobre el potencial de oxido reducción de los mejores medios de enquistamiento diseñados.

Los mejores medios diseñados durante la fase 1 (medio 21) y la fase 2 (medio 21-C) mostraron un potencial de oxido reducción de +110mv \pm 10 y +156.7mv \pm 7.6 respectivamente. En la Tabla 7 puede observarse como se incrementó el potencial de óxido reducción en función directa de la concentración de H₂O₂ en el medio de enquistamiento. Cuando se agregaron 0.5 ml de una solución de H₂O₂ 1.35 mM el potencial de óxido reducción del medio de cultivo fue de +210.7mv \pm 5.1 en el medio 21 y +365mv \pm 13.2 en el medio 21-C.

Tabla 7.- Valores de potencial de óxido-reducción en medios con diferentes concentraciones de H₂O₂

Concentración mM de H ₂ O ₂	Potencial de oxido-reducción (mv)	
	Medio 21	Medio 21-C
0	+110 \pm 10	+156,7 \pm 7.6
0.27	+125,7 \pm 5.1	+226,7 \pm 5.8
0.54	+145,7 \pm 8.1	+253,7 \pm 7.8
0.81	+168,0 \pm 8	+371,7 \pm 16.1
1.08	+194,3 \pm 4.5	+362,3 \pm 13.7
1.35	+210,7 \pm 5.1	+365,0 \pm 13.2

4.5.2 Determinación de la influencia de el potencial de óxido-reducción del medio de enquistamiento sobre la calidad global de los quistes.

La mejor calidad global de los quistes se produjo en los medios 21 con 0.54 y 1.35 mM de H₂O₂ correspondientes a $+145,7 \pm 8.1$ mv y $+210,7 \pm 5.1$ mv. También el medio 21-C con 0.81 mM de H₂O₂ y potencial de óxido-reducción de $+371,7 \pm 16.1$ mv (Fig.8). Este último medio también es un medio bifásico. La calidad global de los quistes alcanzada con estos tres medios fue de 0.681 ± 0.042 para el medio con $+145,7$ mv de 0.684 ± 0.042 para el medio con $+210,7$ mv y 0.648 ± 0.06 para el medio con $+371,7$ mv.

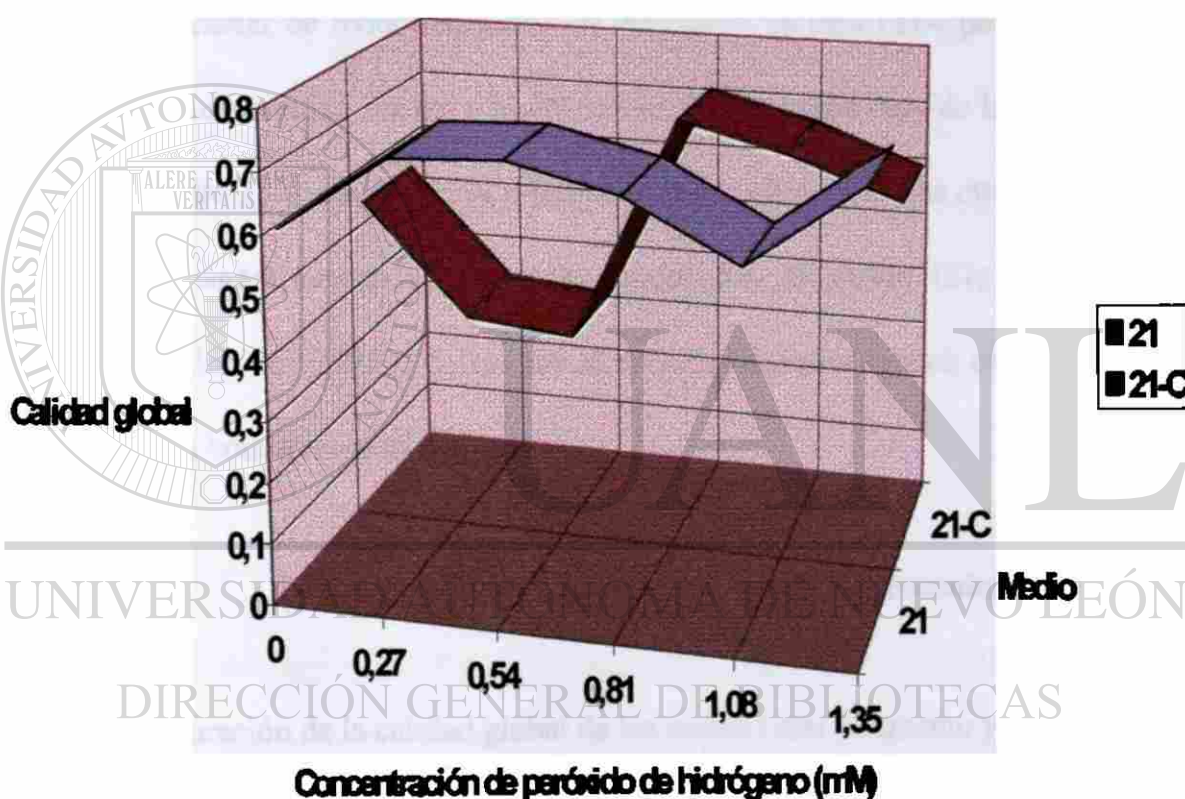


Figura 8.- Influencia de diferentes concentraciones de H₂O₂ en los medios 21 y 21-C. Los mejores medios diseñados con el método Simplex (21 y 21-C) se adicionaron con diferentes concentraciones de peróxido y se prepararon en medio basal sin agentes reductores (ácido ascórbico y L- cisteína). Los trofozoítos en fase de crecimiento logarítmico se incubaron en estos medios a 40°C por 7 días. A los quistes así producidos se les evaluó la calidad global, como se describe en la Fig.3. La mejor calidad global de los quistes se produjo en los medios 21 con 0.54 y 1.35 mM de H₂O₂ correspondientes a $+145,7 \pm 8.1$ mv y $+210,7 \pm 5.1$ mv. También el medio 21-C con 0.81 mM de H₂O₂ y potencial de óxido-reducción de $+371,7 \pm 16.1$ mv

4.5.3. Comparación de la calidad global de los medios con H₂O₂ contra el testigo.

El medio 21 con 0.54 mM de H₂O₂ con potencial de óxido-reducción de $+145,7 \pm 8.1\text{mv}$ (21p4) y el medio 21 con 1.35 mM de H₂O₂ con potencial de óxido-reducción de $+210,7 \pm 5.1\text{mv}$. (21p10), mostraron un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en la calidad global con respecto al testigo y con un medio de apariencia translúcida y monofásico. Mientras el medio 21-C no incrementó su calidad global al agregar H₂O₂ 0.81 mM con potencial de óxido-reducción de $+371,7 \pm 16.1\text{mv}$ (21-Cp6). Además aunque el testigo tenía una calidad similar a la del medio 21 con cualquiera de las concentraciones de H₂O₂. El medio 21-C. con y sin H₂O₂ fueron medios bifásicos en los que el sedimento impide separar de manera adecuada los quistes producidos. El medio (21p10) con potencial de óxido-reducción de $+210,7 \pm 5.1\text{mv}$ fue el mejor medio para inducir el enquistamiento de *E. histolytica* en condiciones axénicas.

4.6 Influencia del sedimento sobre el enquistamiento.

4.6.1. Comparación de la calidad global de los medios con sedimento y sin sedimento.

Los medios con sedimento produjeron por lo general los quistes con mejor calidad global que los medios sin sedimento, aunque las diferencias no son significativas al comparar ambos grupos. En la Tabla 8 es posible observar como en el medio 21 con diferentes concentraciones de peróxido el cual es un medio translúcido con escaso sedimento los cambios en calidad global fueron mínimos al separar el sedimento Mientras en el medio

21-C la calidad global cae un 25% al aspirar y probar la capacidad del sobrenadante de mejorar la calidad global en ausencia de sedimento.

Tabla 8.- Influencia del sedimento sobre la Calidad global en los medios con peróxido.

Medio	Calidad global ^a	
	Medio con sedimento ^b	Medio sin sedimento ^c
21p4 ^d	0,7281	0,7184
21-Cp6 ^e	0,7168	0,541
21p10 ^f	0,7298	0,7028

^a De los quistes formados en los medios.

^b Medio bifásico con sedimento.

^c Medio aspirado sin sedimento.

^d Medio 21 + 0.54 mM de H₂O₂.

^e Medio 21-C + 0.81 mM de H₂O₂.

^f Medio 21 + 1.35 mM de H₂O₂.

4.7 Comparación de la calidad global de los quistes formados en los medios desarrollados en este trabajo

4.7.1. Calidad global de los quistes formados en los medios desarrollados.

Como se observa en la Tabla 9 la calidad global se incrementó 2.18 veces en el mejor medio (21p10) con una diferencia estadísticamente muy significativa ($p < 0.001$) con respecto a la calidad global de las ESQ que se forman de manera espontánea en medio PEHPS.

Tabla 9.- Calidad global de los quistes formados en los medios desarrollados en este trabajo.

Medio	Calidad global ^a	Valor p ^b
PEHPS	0.3237 ± 0.017	
21	0.5869 ± 0.004	0.0005 ^c
21-C	0.7013 ± 0.021	0.00001 ^c
21p10 ^d	0.7002 ± 0.028	0.00007 ^c

^a Promedio de tres ensayos ± error estándar.

^b Para una prueba *t* de student de una cola con respecto al testigo.

^c $p < 0.05$ diferencias estadísticamente significativas.

^d Medio 21 con 1.35 mM de H₂O₂.

4.8 Rendimiento de los medios de enquistamiento desarrollados en este trabajo

4.8.1 Determinación del porcentaje de formación de quistes en los medios diseñados.

Los porcentajes de formación de quistes variaron desde 0.54 ± 0.055 en el medio 21p4 hasta 0.61 ± 0.036 en el medio 21. Sin embargo los rendimientos de todos los medios no mostraron diferencias significativas cuando se compararon con el resto de los medios (Tabla 10).

Tabla 10.- Porcentaje de formación de quistes en medios diseñados

Medio	Porcentaje de formación de quistes
21	0.61 ± 0.036^b
21-C	0.57 ± 0.072^b
21p4 ^a	0.54 ± 0.055^b
21p10 ^a	0.58 ± 0.038^b
21-Cp6 ^a	0.57 ± 0.035^b

^a Concentración 0.54, 1.35 y 0.81 mM de H₂O₂, respectivamente.

^a Promedios de tres ensayos \pm error estándar.

^b Los valores de *p* para los promedios de los rendimientos de estos medios no mostraron diferencias significativas en una prueba *t* de student de 2 colas $p = 0 > 0.05$.

4.9 Concentraciones y valores de los medios en que se forman quistes con mejor calidad global

4.9.1 Concentraciones de factores en los mejores medios de enquistamiento diseñados.

Como se observa en la Tabla 11 las concentraciones de suero bovino, glucosa, Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ca²⁺, B³⁺ establecidos durante la primera fase de optimación no se modificaron. Además nótese como se eliminaron del medio de enquistamiento los factores reductores (ácido ascórbico y L- cisteína) y los fosfatos. Así el mejor medio contiene las mismas concentraciones de factores que el medio 21 más H₂O₂. 1.35 mM pero sin agentes reductores.

Tabla 11.- Composición de los medios en que se forman los quistes con mejor calidad global

Concentraciones	Medio		
	21	21-C	21p10
Suero bovino %	8	8	8
Glucosa ^a	16.6	16.6	16.6
Boro ^a	2	2	2
Calcio ^a	4	4	4
Magnesio ^a	1.5	1.5	1.5
Manganeso ^a	5.5	5.5	5.5
Cobalto ^a	10	10	10
Ácido Ascórbico ^a	0.035	0.035	0
L-Cisteína ^a	0.1	0.1	0
Fosfato de potasio mono y dibásico ^a	0	33	0
Peróxido de hidrógeno ^a	0	0	1.35

^a Concentración mM

4.9.2 Valores de condiciones fisicoquímicas de los medios donde se formaron los quistes de mejor calidad global.

Aún en los medios considerados como mejores, los valores de pH, temperatura, potencial de óxido-reducción y osmolaridad presentan variaciones importantes. Principalmente entre el medio (21p10) con potencial de óxido-reducción de $+210,7 \pm 5.1$ mv fue el mejor medio para inducir el enquistamiento y el mejor medio de la fase 2 de optimización (21-C). Los valores óptimos de los factores mencionados pueden observarse en la Tabla 12.

Tabla 12.- Condiciones fisicoquímicas de los medios donde se produjeron los quistes con mejor calidad global

Condiciones fisicoquímicas	Medio		
	21	21-C	21p10
pH	6	5.3	6.72
Temperatura ^b	37	40	40
Osmolaridad ^c	284	365	226
Potencial de óxido-reducción ^d	+143	+130	+225

^a Valores promedio de tres ensayos

^b En grados centígrados

^c Expresada en mOsm/kg

^d Expresada en mv

4.10 Aspecto microscópico de los quistes formados en el mejor medio de enquistamiento



4.10.1 Microscopia de luz de los quistes de *E. histolytica* formados en los medios desarrollados.

La apariencia microscópica de los quistes formados en los medios diseñados durante el desarrollo de esta tesis, captada con un microscopio Axiophot equipado con un sistema automático de fotografía integrado, mostró que los quistes formados en el medio 21p10 al ser observados en contraste de fases, tenían, a diferencia de los trofozoítos y de las ESQ formadas espontáneamente en PEHPS la presencia en su superficie de una estructura refringente que sugiere la presencia de pared celular. Además, los quistes formados en el medio 21p10 tenían núcleos con cromatina dispuesta en forma característica de rueda de carreta generalmente con cariosoma central. Mientras los quistes formados en los medios 21 y 21-C en raras ocasiones mostraron la presencia de núcleos y cuando éstos, se llegaban a presentar no estaban bien definidos y su cromatina aparentemente no presentaba ninguna disposición especial (Fig 9). Los quistes formados en el medio 21p10 tenían un diámetro de 6 a 14µm mostraban un citoplasma granular y vesículas pequeñas en su interior sin presencia de cuerpos cromatoides (Fig 9).

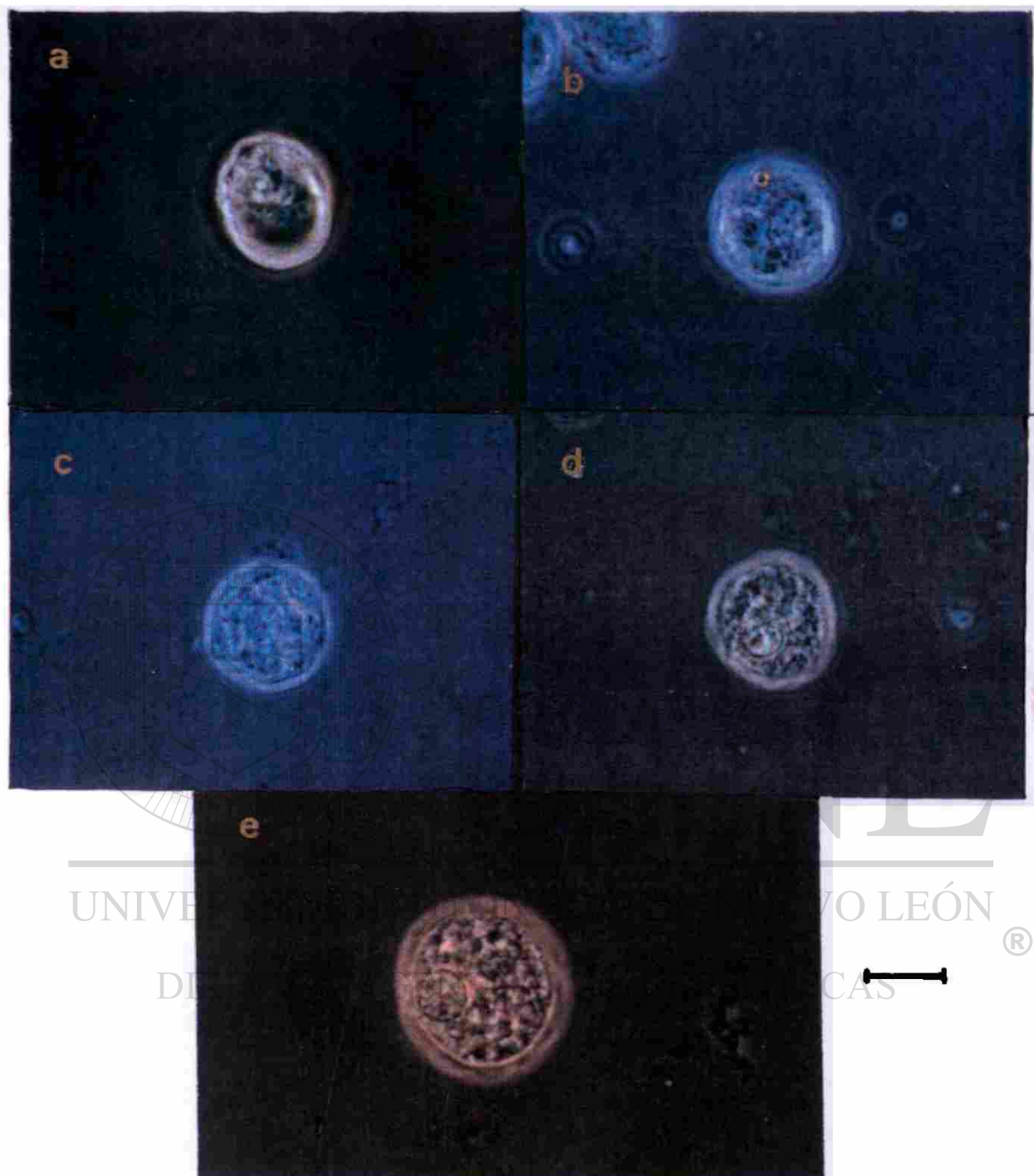


Figura 9.- Observaciones microscópicas en fotomicroscopio Axiophot con técnica de contraste de fases, aumento de 100x de trofozoitos (A), ESQ's (B), quistes formados en medio 21 (C), quistes formados en medio 21-C (D) y quistes formados en medio 21p10 (E). Donde pudimos observar como los quistes formados en el medio 21p10 mostraron una forma más regular , la presencia de núcleos con mayor frecuencia y una superficie refringente que sugiere la presencia de pared celular (Barra = 10 μ m).

Cuando se comparó la apariencia microscópica de los quistes formados en el medio 21p10, con la de las ESQR formadas en los medios diseñados por Campos Góngora E., los trofozoítos y las ESQ formadas de manera espontánea en medio PEHPS, se observó que los quistes formados en el nuevo medio presentaron una superficie refringente que sugiere la presencia de pared celular, forma esférica con tamaño entre 6 y 14 μm , con citoplasma granular y vesículas pequeñas, de uno a cuatro núcleos, con cariosoma por lo general central. Las ESQR's formadas en los medios ME20 y ME10 en su mayoría no muestran una superficie refringente, no tienen forma ni tamaño regular, su superficie externa es irregular, no tienen núcleos bien definidos; su citoplasma no mostraba vesículas, sino gránulos densos en su interior. Las ESQ no tenían la pared, característica esencial de los quistes. Los trofozoítos no tenían estructuras que sugirieran la presencia de pared celular y en su mayoría no tenían forma esférica (Fig 10).

Durante la observación de los cortes semifinos de los quistes teñidos con tetraóxido de osmio lo quistes formados en el medio 21p10, a diferencia de los quistes formados en los medios 21 y 21-C mostraron la presencia de una estructura fibrilar acordonada y continua, que después de la fijación y tinción de los quistes quedó suspendida en la matriz que rodea a los quistes y en algunas partes contigua a la membrana celular. Además, estos quistes mostraron la presencia de vacuolas cercanas a la membrana celular y conteniendo un material denso y fibrilar en su interior. Por otro lado los quistes formados en los medios 21 y 21-C mostraron una estructura esférica regular con presencia de vacuolas escasas en su citoplasma y pocas células con núcleo (Fig 11).

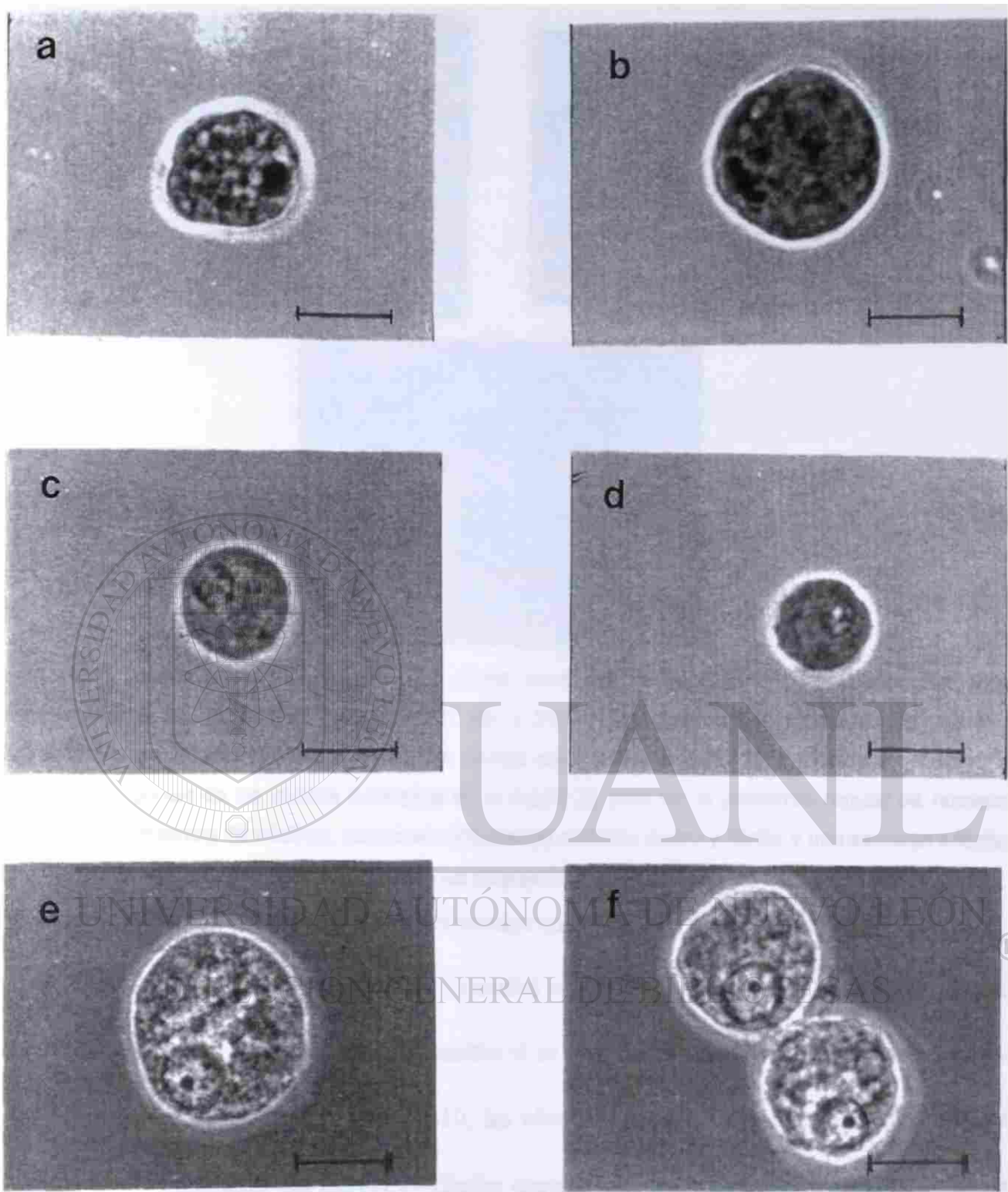


Fig 10.- Observaciones en fotomicroscopio Axiophot con técnica de contraste de fases aumento de 100x de trofozoítos (A), ESQ's (B), ESQR's formadas en medio ME10 (C) y ME20 (D) y quistes formados en medio 21p10 (E y F). Donde se observó que a diferencia de las otras estructuras en esta figura los quistes formados en el medio 21p10 mostraron forma esférica, regular, con superficie refringente, con núcleos bien definidos con cromatina dispuesta en forma de rueda de carreta y con cariosoma central (Barra = 10 μ m).

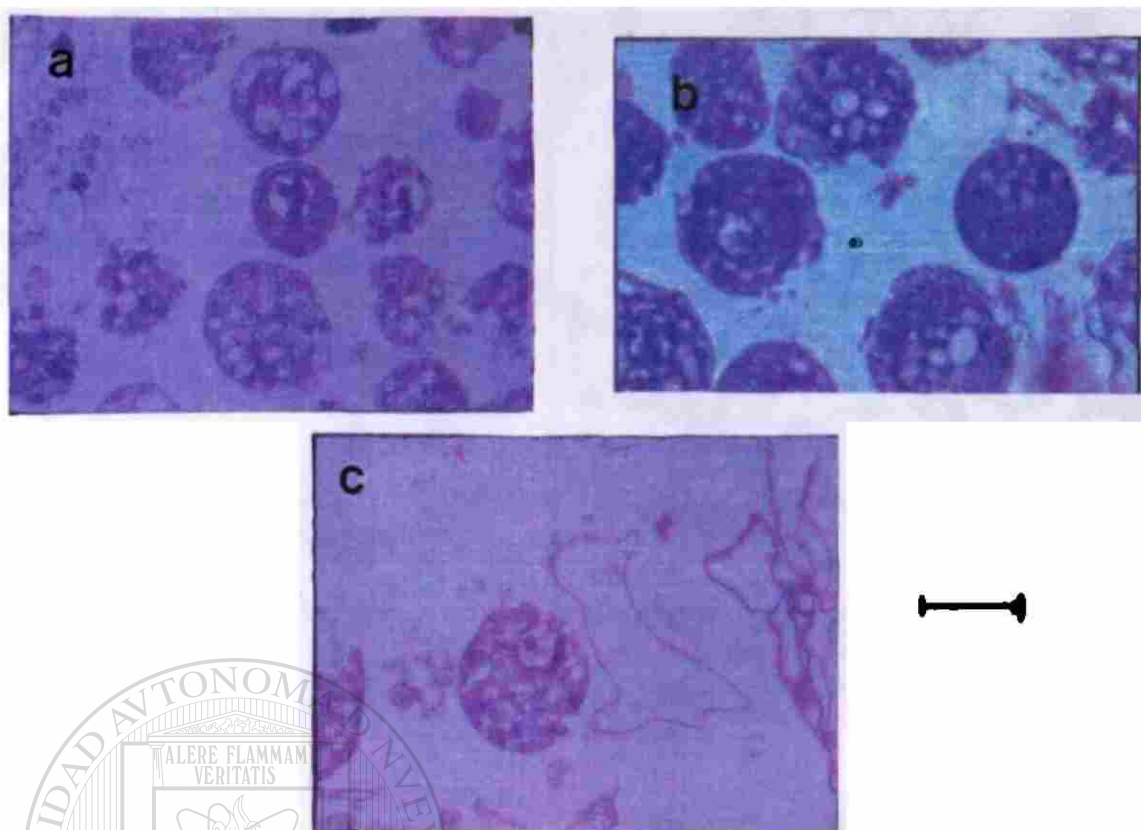


Fig 11.- Observaciones microscópicas de cortes semifinos de quistes de *E. histolytica* formados axénicamente en los medios 21 (A), 21-C (B) y 21p10 (C), teñidos con tetraóxido de osmio y observados en fotomicroscopio Axiophot en campo claro y aumento de 100x. Donde se observó la forma homogénea de los quistes cultivados en el medio 21 pero sin la presencia regular de núcleos. Además la presencia de núcleos, vacuolas conteniendo material denso y fibrilar y una estructura fibrilar continua cercana a la membrana celular de los quistes formados en el medio 21p10 (Barra = 10 μ m).

4.10.2. La ultraestructura de los quistes formados en los medios desarrollados

La ultraestructura de los quistes formados en los medios 21p10, 21 y 21-C no mostró presencia de cuerpos cromatoides. En cambio si se observó un citoplasma muy vacuolado en las células producidas en el medio 21p10, las observaciones a los quistes formados en este mismo medio mostraron una estructura fibrilar alargada de μ m de espesor, continua, adherida (solo en pequeños segmentos) a la membrana celular, citoplasma con vacuolas cercanas a la membrana celular y conteniendo material denso fibrilar (Fig 12). De estas imágenes puede deducirse que esta estructura cubría la superficie de los quistes formados en el medio 21p10, pero se desprendió por alguna causa que desconocemos.

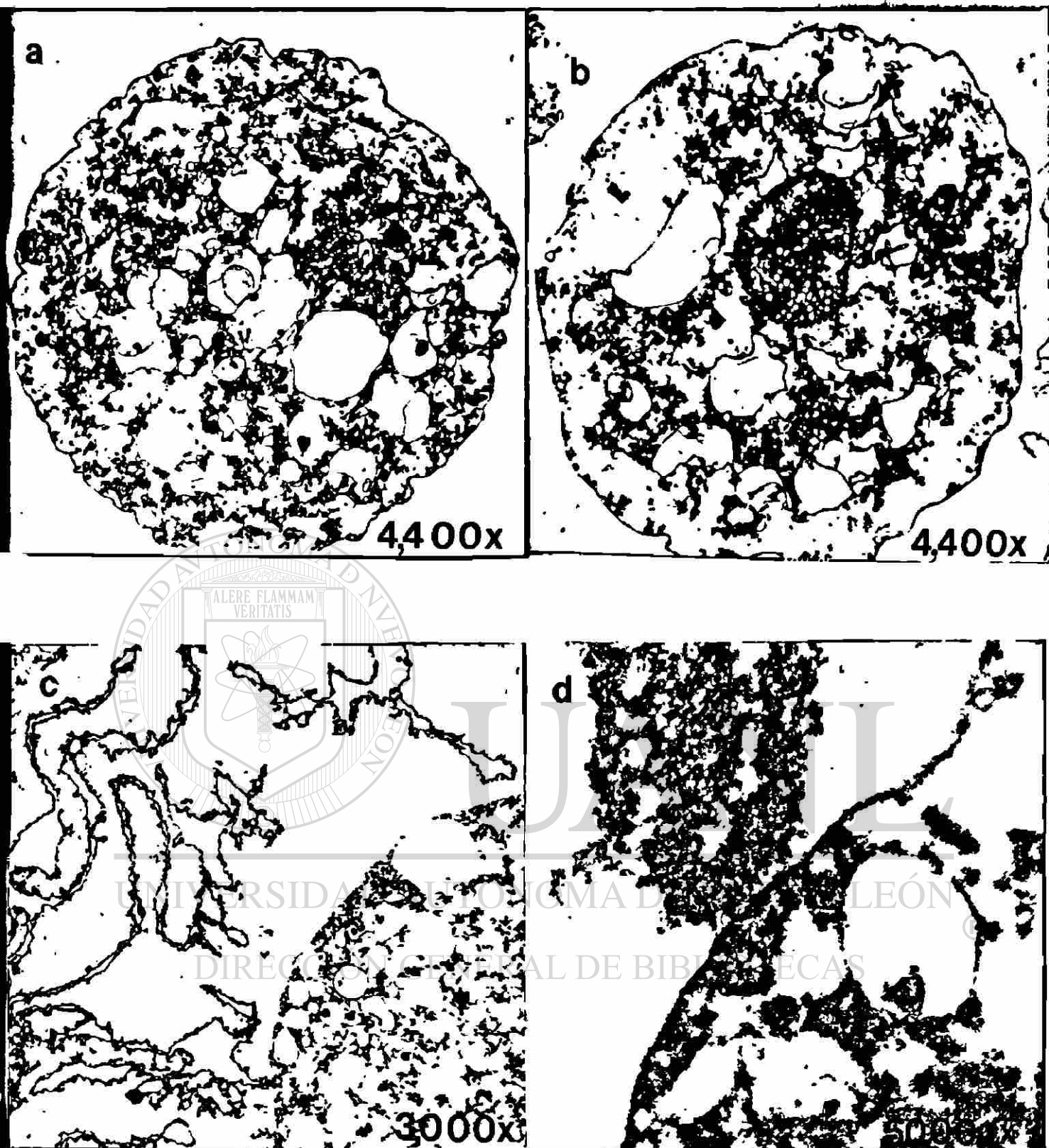


Figura 12.- Observaciones en microscopio electrónico de transmisión de los quistes formados en los medios 21 (A), 21-C (B) y 21p10 (C y D). Donde se puede observar la ausencia de cuerpos cromatoides en los quistes formados en todos los medios, la falta de pared celular en los quistes producidos en los medios 21 y 21-C y la presencia de una estructura fibrilar continua cercana al exterior de la membrana celular y vacuolas conteniendo material denso fibrilar en los quistes formados en el medio 21p10.

4.11. Comparación del incremento de los porcentajes de quistes que cumplen con los parámetros de calidad biológica formados en los mejores medios diseñados con respecto a los porcentajes de las ESQ formadas en medio PEHPS.

4.11.1 Incremento en los porcentajes de quistes que cumplen con los parámetros de calidad biológica

Los quistes diseñados en estos nuevos medios fueron mejorando su calidad sistemáticamente a medida que progresó el proyecto aplicando el método Simplex. Lo anterior considerando cada uno de los parámetros de calidad biológica por separado. Esto puede ser observado en la Fig. 13. Así podemos notar como se incrementan los porcentajes de quistes que resisten al Sarcosyl al 0.1%, son birrefringentes, tienen forma y tamaño de quistes, con superficie refringente y núcleos.

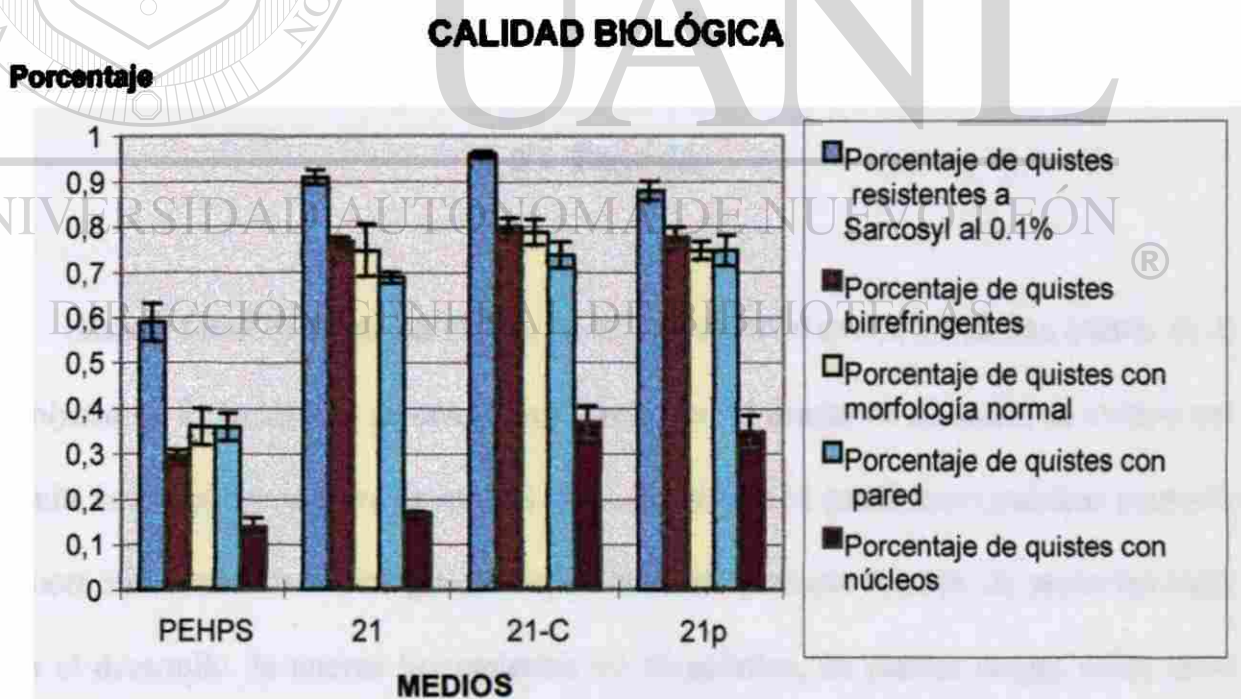


Fig 13.- Análisis del incremento en los parámetros de calidad biológica en los mejores medios diseñados. Los porcentajes de quistes que cumplían con cada uno de los factores de calidad biológica por separado se evaluaron en los mejores medios diseñados. Graficándose los promedios de los porcentajes de tres ensayos \pm error estándar.

4.12 Determinación de la capacidad de desenquistarse

4.12.1. Determinación de la capacidad de desenquistamiento de los quistes formados en el medio 21p10.

Los quistes formados en medio 21p10 no fueron capaces de desenquistarse cuando se cosecharon y se inocularon directamente en medio PEHPS fresco o cuando se cosecharon y se inocularon en medio PEHPS fresco después de ser tratados con choque ácido con HCl 0.1 N o con una mezcla de 2.5 u de quitinasa y 10 mg de tripsina y se incubaron a 37°C hasta por 15 días.



CAPITULO 5

DISCUSIÓN

5.1 Discusión

Hasta la fecha no existe un medio, ni un método en el que se produzcan quistes de *E. histolytica* en forma masiva en condiciones axénicas. El diseño de un medio de cultivo que permita la producción masiva de quistes de *E. histolytica* en condiciones axénicas permitirá conocer más acerca de la biología de este protozooario parásito. Además de sentar las bases para el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico, de nuevas drogas útiles en el tratamiento de la Amibiasis y de vacunas para prevenir dicha enfermedad.

Cabe señalar que aún a pesar del desarrollo de vacunas que estimulan la producción de anticuerpos y protegen de la formación del absceso hepático en gerbils (Zhang T, 1995), estas no inhiben el proceso de enquistamiento permitiendo la diseminación del parásito a organismos susceptibles. Lo que remarca la necesidad de conocer los mecanismos disparadores de este proceso abriendo así la oportunidad de romper el ciclo biológico de este protozooario permitiendo el control, quizás mas efectivo de esta enfermedad.

Entamoeba histolytica es capaz de formar ESQ de manera espontánea en cultivos envejecidos en medio PEHPS (Said Fernández S y cols, 1993), lo que no sucede en otros medios para el cultivo axénico de este protozooario (Martínez-Palomo A, 1982).

Las ESQ formadas espontáneamente en medio PEHPS son morfológicamente indistinguibles de los quistes naturales, teñidos con colorante de Gomori y observados en campo claro. Sin embargo estas ESQ formadas en condiciones axénicas tienen una pared inmadura o defectuosa ya que son viables hasta por 92 h a 4°C, en un medio hipotónico (55 mOsm/Kg), pero mueren en agua bidestilada o en presencia de Sarcosyl al 0.2%, condiciones que los quistes naturales sí son capaces de resistir (Martínez-Palomo A, 1982).

Las ESQR formadas en medio PEHPS adicionado con Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} tienen una pared celular más resistente al efecto de SDS al 1%. Además se incrementó 120 veces la producción de N-acetilglucosamina. Sin embargo las ESQR formadas en ese medio cuando se observan al microscopio electrónico tienen estructuras anormales en la pared celular y en el citoplasma, que no se observan con tetraóxido de osmio pero sí con rojo de rutenio (Campos-Góngora E, 1996).

Para el presente proyecto consideramos que existen factores que influyen favoreciendo o inhibiendo el enquistamiento, y que utilizando el método Simplex era posible diseñar un medio donde se produzcan en forma masiva quistes de *E. histolytica* en condiciones axénicas con mejor calidad biológica que las ESQ y ESQR formadas en los medios PEHPS y PEHPS adicionado con Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} .

Empezamos por definir el concepto de calidad biológica. Como las principales limitantes de las ESQ y los ESQR formadas en los medios de enquistamiento desarrollados hasta la fecha son la falta de una pared bien formada y resistencia al efecto de detergentes. Estos parámetros fueron incluidos en la evaluación de la calidad global. Se evaluaron cinco características a los quistes formados en los medios desarrollados durante esta tesis como parámetros para determinar la calidad global de los quistes formados. Primero propusimos probar la capacidad de los quistes de resistir el efecto del Sarcosyl al 0.1%, ya que ni los trofozoítos ni las ESQ's resisten este tratamiento. A partir de ese momento se evaluaron el resto de los parámetros sólo a los quistes que resistieron al efecto del Sarcosyl al 0.1%. Enseguida, se calculó el porcentaje de los quistes formados que tenían forma redondeada, tamaño entre 6 y 12 μm con citoplasma granular y vesículas pequeñas, puesto que esta es la forma y el tamaño de los quistes naturales (Martínez-Palomo A, 1982). Luego se calculó el porcentaje de quistes que observados al microscopio de luz con técnica de contraste de fase tuvieran una superficie refringente (sugere de la presencia de pared celular) con la intención de mejorar la apariencia microscópica de los ESQR formados en el medio adicionado con metales, además de que esa misma pared les daría a los quistes mayor resistencia al efecto de detergentes. La pared es un factor importante para que los quistes

naturales resistan situaciones medio ambientales adversas como: calor, desecación y medios hipotónicos. Se determinó el porcentaje de quistes birrefringentes como índice de viabilidad (García-Zapien AG, 1995). Finalmente se determinó el porcentaje de quistes con núcleos que es una característica esencial. La mayor parte de las ESQ formadas espontáneamente en medio PEHPS pierden el núcleo entre el 6° y 10° días de incubación (Said-Fernández S, 1993). Se buscó incrementar el porcentaje de quistes con los factores de calidad mencionados tratando de diseñar el medio donde se formaran grandes cantidades de quistes de buena calidad, más que buscar producir quistes de muy buena calidad tan solo en pequeñas proporciones de el total de quistes formados.

El método Simplex es un modelo matemático que permite evaluar la interacción de varios factores sobre una respuesta determinada. Este método se utiliza rutinariamente en la industria y ha sido utilizado en investigaciones biomédicas con buenos resultados (Campos-Góngora E, 1996, Escamilla-Treviño L.L., 1996). En nuestro trabajo se utilizó el método

Simplex modificado para múltiples variables y múltiples respuestas, permitiéndonos alcanzar nuestros objetivos con eficiencia en un período corto de tiempo.

Para iniciar el proyecto, se estandarizaron los medios de cultivo. Se prepararon 8 L de extracto de hígado y páncreas (Said-Fernández S y cols, 1988) y 8 L de suero bovino. Para disminuir la variabilidad en los experimentos, se utilizaron suero bovino y extracto de hígado y páncreas de este único lote para preparar los medios de cultivo durante el desarrollo de la tesis. Enseguida se inició a resembrar la cepa HM-1 IMSS en medio PEHPS (Said-Fernández S y cols, 1988). Después de siete resiembras de la cepa en este medio de cultivo se realizó una curva de crecimiento con el fin de determinar el tiempo en que se debían realizar las

resiembras. Se encontró que la fase de crecimiento logarítmico de nuestra cepa en el medio PEHPS se alcanzó entre las 48 y 96 h, motivo por el cual las resiembras se continuaron realizando cada 96 h.

Antes de analizar el efecto de diferentes factores sobre el enquistamiento se decidió determinar el tiempo adecuado para cosechar los quistes producidos en los nuevos medios por diseñar. Se sabía que *E. histolytica* forma ESQ de manera espontánea en medio PEHPS cuando los trofozoitos inoculados en ese medio se dejan sin sembrar por 9 días. Sin embargo estas ESQ no resisten el efecto de detergentes (Said-Fernández S y cols, 1993). Entonces se realizó un ensayo utilizando el medio ME20 (Campos-Góngora E., 1996); El cual contiene medio PEHPS adicionado con $MgCl_2$ 1.22 mM, $MnCl_2$ 14.44 mM y $CoCl_2$ 19.44 mM, que produce ESQR que resistían al efecto del SDS al 1%. La producción de ESQR se incrementó después del cuarto día de incubación alcanzando la máxima producción al octavo día, motivo por el cual a partir de ese momento la cosecha de quistes se realizó siempre en el octavo día de incubación.

Para iniciar este trabajo seleccionamos una sub-población de amibas partiendo de la cepa HM-1:IMSS con la capacidad de formar ESQ espontáneamente en medio PEPHS. Esto con el objeto de incrementar la eficiencia del enquistamiento. Con esta población seleccionada se trabajó durante todo el desarrollo de la tesis.

Cuando analizamos la influencia del LCR y el sustituto de suero PACSR sobre el enquistamiento de *E. histolytica* determinando la calidad global de los quistes formados en cada uno de los medios. Se encontró que los quistes que se formaron en presencia de LCR tenían una calidad global superior a los formados en medio con PACSR. Aunque los quistes

de mejor calidad se observaron en el medio de cultivo con suero bovino sin LCR ni PACSR. Se decidió incluir en el estudio al LCR y no al PACSR como factor que influye sobre el enquistamiento. Para determinar la concentración adecuada de LCR se incluyó como factor en el ensayo de optimación utilizando el método Simplex.

Debido a la dificultad técnica para trabajar con más de 60 tubos de cultivo con diferentes concentraciones y valores de factores en un mismo tiempo. Se decidió dividir la optimación en dos fases. En la primera fase se optimaron las concentraciones de 10 factores químicos. Se diseñaron 25 medios de cultivo: El medio 11 se utilizó como testigo: Este medio indujo la formación de quistes con calidad global de 0.5474 y calidad global relativa de 1.0. El mejor medio diseñado fue el medio 21 donde se formaron quistes con una calidad global relativa de 1.11. Esta fue 3.5 veces superior a la obtenida por los quistes formados en el peor medio diseñado y 1.8 veces mejor que la calidad de las ESQ formadas de manera espontánea en medio PEHPS. La concentración óptima de los factores analizados durante esta primera fase fue suero bovino 8% , glucosa 16.6 mM , Mg^{2+} 1.5 mM, Mn^{2+} 5.5 mM, Co^{2+} 10 mM, Ca^{2+} 4 mM, B^{3+} 2 mM. LCR 0%, vitaminas 0% y extracto de hígado y páncreas 0%. Nótese como durante esta fase se optimó la concentración de 7 factores químicos y se eliminaron LCR, vitaminas y extracto de hígado y páncreas como factores que no se requieren para la formación de quistes de *E. histolytica* en condiciones axénicas con buena calidad biológica. Para dar por concluida esta fase de optimación se consideraron dos situaciones: la primera fue que después de alcanzarse la mejor calidad global en el medio 21. Se realizaron más ensayos de acuerdo a lo planteado por el método Simplex sin obtener un incremento en la calidad global de los quistes formados en los nuevos medios diseñados. La

segunda fue que las concentraciones de los factores analizados oscilaron inicialmente en un rango muy amplio y conforme avanzó el estudio oscilaron en un intervalo cada vez más reducido y cercano a las concentraciones óptimas de los factores donde se produjo la mejor calidad global. Durante la segunda fase de optimación se determinaron los valores que produjeron los mejores resultados de 4 factores fisicoquímicos y la concentración de fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio monobásico sobre la formación de quistes de *E. histolytica* en condiciones axénicas. El medio 21 se utilizó como testigo durante esta segunda etapa con el fin de tener una base de comparación de resultados entre las dos fases. Las concentraciones de los factores contenidos en el medio 21 son las mismas que las encontradas en cada uno de los medios diseñados en esta fase. Las diferencias entre el testigo y los medios diseñados fueron en los valores y concentraciones de los 5 factores analizados durante esta fase. Se diseñaron y probaron 15 medios de los cuales el mejor fue el medio 21-C los valores y concentraciones de los factores incluidos en este medio fueron los siguientes: fosfatos 33 mM, pH 5.3, temperatura 40°C, osmolaridad 365 mOsm/kg y potencial de óxido reducción +130mv., suero bovino 8% , glucosa 16.6 mM , Mg^{2+} 1.5 mM, Mn^{2+} 5.5 mM, Co^{2+} 10 mM, Ca^{2+} 4 mM, B^{3+} 2 mM. En este medio se formaron quistes con calidad global relativa de 1.20, es decir que la calidad global de los quistes se incrementó 1.2 veces con respecto a la primera fase. Sin embargo, el medio 21-C que produjo los mejores resultados en esta fase fue un medio bifásico con una cantidad de sedimento considerable, lo que dificultó la cosecha de los quistes y la observación microscópica de los mismos. Las concentraciones y valores óptimos de los factores analizados en esta fase fueron los siguientes: fosfatos 33 mM, pH 5.3, temperatura 40°C, osmolaridad 365 mOsm/kg y

potencial de óxido reducción +130mv. Además de los factores ya mencionados para el medio 21 los cuales no variaron (suero bovino 8% , glucosa 16.6 mM , Mg^{2+} 1.5 mM, Mn^{2+} 5.5 mM, Co^{2+} 10 mM, Ca^{2+} 4 mM, B^{3+} 2 mM). Nos llamó la atención como las condiciones favorables para inducir el enquistamiento no son compatibles con el crecimiento de trofozoítos. Esto es explicable si se considera que el enquistamiento es un mecanismo de defensa que utilizan los parásitos para sobrevivir aun en condiciones ambientales extremas. Por lo que estas mismas condiciones pueden ser disparadoras del enquistamiento.

Durante esta fase utilizamos el manitol como agente reductor en el medio de cultivo con el cual pudimos modificar el potencial de óxido reducción en un rango entre +80 y +180mv. El mejor medio no tenía manitol y mostró un potencial de óxido-reducción de +130mv. Cabe mencionar que la solución basal de enquistamiento contenía además otros factores reductores como la L-cisteína y el ácido ascórbico. Decidimos diseñar un ensayo utilizando sólo peptona como solución basal y eliminando los agentes reductores. Además se utilizó H_2O_2 como factor oxidante en el medio de cultivo. Se probaron diferentes concentraciones de H_2O_2 aplicados a los mejores medios diseñados durante las dos fases de optimización con variaciones en el potencial de óxido reducción entre +125 y +371mv. Los quistes de mejor calidad global se produjeron en el medio 21 con potencial de óxido-reducción de +210mv (21p10) y en el medio 21-C con potencial de óxido-reducción de +371mv (21Cp6). Sin embargo como el medio 21-C con y sin H_2O_2 es un medio bifásico con las dificultades que ello implica.

Enseguida se evaluó la calidad global de los quistes formados en los mejores medios de cultivo con sedimento y los mismos medios descartando el sedimento. Se observó como

la calidad global de los quistes fue superior en los medios con sedimento. Sobre todo en el medio (21Cp6). Esto sugiere que existen factores que precipitan en el medio y son esenciales para la formación de quistes de mejor calidad.

Concluimos que el mejor medio para inducir el enquistamiento de *E. histolytica* en condiciones axénicas fue el medio 21 con potencial de óxido-reducción de +210mv. En este medio se produjeron quistes con una calidad global 2.18 veces superior a los formados espontáneamente en medio PEHPS con una diferencia estadística muy significativa ($p < 0.001$).

Los rendimientos de los medios en que se produjo la mejor calidad de los quistes fue cercana al 60% sin diferencias significativas entre ellos. Esto permite la producción masiva de quistes en este nuevo medio diseñado.

Al evaluar los parámetros de calidad global por separado para determinar en que parámetros se mejoró de manera más importante. Observamos como los porcentajes de quistes formados en el medio 21p10 y que cumplían con los parámetros de calidad establecidos para este trabajo fueron superiores en todos los aspectos a los porcentajes de las ESQ formadas en medio PEHPS que cumplían con estos mismos parámetros de calidad. Los mayores incrementos al comparar los porcentajes se observaron en: porcentaje de quistes con presencia de núcleos que fue de 38% en medio 21p10 y en el medio PEHPS 13% con un incremento de 2.9 veces. Con respecto al porcentaje de quistes birrefringentes en el medio 21p10 fue de 78% y en el medio PEHPS 29% con un incremento de 2.7 veces. Como la calidad global se incrementó sistemáticamente en cada uno de los parámetros que se diseñaron para evaluarla. Es posible que se haya estimulado una serie de eventos que

culminan en la formación de un quiste lo que es mejor que estimular sólo una enzima que produzca un componente de la pared.

Cuando se observó la apariencia microscópica de los quistes formados en el medio 21p10 bajo el microscopio de luz y con técnica de contraste de fases pudimos notar la presencia de una superficie refringente, tamaño similar al de los quistes naturales, citoplasma granular con vesículas pequeñas y la presencia de núcleos con la cromatina dispuesta en rueda de carreta, con cariosoma por lo general central, cuando se compararon los quistes formados en este medio con las ESQR formadas en los medios adicionados sólo con Mg^{2+} , Mn^{2+} , y Co^{2+} (Campos-Góngora E, 1996), se observó como los quistes formados en el medio 21p10 tenían citoplasma con vacuolas y vesículas pequeñas, mientras el citoplasma de los ESQR formados en los medios ME10 y ME20 tenían gránulos muy densos que en ocasiones impedían observar el resto de las estructuras citoplásmicas. Además los quistes formados en el medio 21p10 tuvieron una superficie refringente que sugiere la presencia de pared mientras las ESQR tienen una superficie irregular que no es refringente en la mayor de las veces. Si comparamos los quistes formados en medio 21p10 con los formados en los medios 21 y 21-C, la principal diferencia se encuentra en que los quistes formados en el medio 21p10 tienen una mayor proporción de células nucleadas, además de citoplasma con un mayor número de vacuolas. La diferencia primordial al observar y comparar entre los quistes formados en el medio 21p10 y los trofozoítos y las ESQ's, es la superficie refringente que sugiere la presencia de pared celular, cuya presencia es el motivo por el cual los quistes resisten condiciones ambientales adversas (Diamond LS, 1990). A pesar de tener una apariencia microscópica más parecida a la de los quistes naturales que el resto de las

estructuras formadas hasta ahora en el intento de producir quistes de *E. histolytica* en forma masiva en condiciones axénicas. Estos quistes formados en el medio 21p10 carecen de cuerpos cromatiodes descritos en los quistes maduros de *E. invadens* (Morales-Vallarta M, 1995) y en los quistes naturales (Martinez-Palomo A, 1982).

Cuando se analiza la estructura ultramicroscópica de los quistes de *E. histolytica* formados en condiciones axénicas en el medio 21p10. Llama la atención la presencia de una estructura fibrilar continua y adosada a la membrana celular solo en pequeños tramos. Por estas características nosotros proponemos que esta estructura se trata de la pared celular. La cuestión es: ¿Por que se desprende casi por completo de la membrana celular de los quistes? Existen por lo menos dos posibles explicaciones: La primera es de que se haya formado la pared y por algún motivo las técnicas de fijación inadecuadas aunadas a la desecación y las centrifugaciones repetidas hayan dañado la ultraestructura de la pared posterior a la observación en fresco. Esta es una posibilidad aceptable dado que en las preparaciones en fresco observadas con contraste de fases no encontramos paredes desprendidas (Fig 9 y 10). Otra posibilidad es el H₂O₂ inicialmente pudo haber inducido al enquistamiento pero posteriormente causó daño por oxidación dañando a las estructuras celulares irreversiblemente, lo que produjo los cambios observados en los quistes.

El enquistamiento es un proceso complejo en el que intervienen una serie de factores. En este trabajo todos los factores fueron analizados de manera simultánea y sistemática con la ayuda del método Simplex. Es posible, sin embargo que existan otros factores que también influyan sobre el enquistamiento, además de los analizados durante el presente estudio. Por lo mismo la calidad de los quistes formados en este nuevo medio podrá mejorarse aún más

analizando el efecto de otros factores. Por ejemplo Morales Vallarta y cols encontraron que en PEHP saturado con CO₂ se forman estructuras parecidas a quistes de *E. histolytica* en condiciones axénicas que tienen cuerpos cromatoides (Morales-Vallarta M, 1995). Como los quistes formados en el medio 21p10 no tienen estas estructuras, será muy interesante investigar si preincubando los trofozoítos en medio PEHP saturado con CO₂ y luego induciendo el enquistamiento en medio 21p10 se forman quistes con cuerpos cromatoides y una pared más estable. Por otro lado queda claro que las condiciones oxidantes del medio inducidas por H₂O₂ favorecieron notablemente la síntesis de una estructura que sugiere ser una pared gruesa pero lábil. Es importante investigar el efecto del tiempo de exposición a estas condiciones oxidantes y el efecto del potencial de oxido-reducción sobre la estabilidad de la pared.

5.2 CONCLUSIONES

Se diseñó un nuevo medio de cultivo donde se formaron quistes que observados en microscopio de luz son muy similares a los naturales, por primera vez se logró formar una pared gruesa, electrodensa, visible con ME de transmisión, pero esta pared se desprende de la superficie de los quistes. Además los quistes formados en este nuevo medio de cultivo tienen una calidad biológica 2.18 veces superior a la de las ESQ desarrolladas en medio PEHPS.

El rendimiento promedio de los quistes formados en este nuevo medio de cultivo fue cercano a un 60%, lo que permite la producción masiva de quistes con las características arriba mencionadas.

Este nuevo medio de cultivo es un medio translúcido, semidefinido, que no requiere extracto de hígado y páncreas, por lo que es de más fácil preparación que el medio PEHPS. Este medio no requiere Manitol, LCR, vitaminas ni solución amortiguadora de fosfatos de Sorensen. Algunos de estos componentes son bastante caros como el LCR y las vitaminas. Otros requieren de procesos complejos en su preparación, como la solución amortiguadora de fosfatos de Sorensen.

Los valores y concentraciones de los factores incluidos en este nuevo medio son los siguientes: suero bovino 8% , glucosa 16.6 mM , Mg^{2+} 1.5 mM, Mn^{2+} 5.5 mM, Co^{2+} 10 mM, Ca^{2+} 4 mM, B^{3+} -2 mM, pH 6.72, temperatura 40°C, osmolaridad 226 mOsm/Kg y potencial de oxido reducción +225mv.

5.3 PERSPECTIVAS

Aunque la apariencia de estos quistes al microscopio de luz es similar a la de los quistes naturales, además de ser refringentes y resistir el efecto de detergentes. Falta por mejorar la apariencia ultramicroscópica de los quistes formados en este nuevo medio, lograr que estos quistes se desenquisten *in vivo* e *in vitro*, evaluar su capacidad infectiva. Si estos quistes reúnen las características necesarias para considerarlos muy semejantes a los naturales, será posible utilizarlos para diseñar nuevas herramientas diagnósticas, nuevos fármacos y aislar en ellos antígenos que sirvan para diseñar una vacuna contra la Amibiasis.

Es posible que existan otros factores que favorezcan el enquistamiento de este protozoo parásito y que aplicados a un medio de cultivo mejoren aún más la calidad de los

quistes formados en nuestro medio. Se propone utilizar el nuevo medio diseñado por nosotros para futuras investigaciones sobre el enquistamiento axénico de *E. histolytica*.

Este nuevo medio diseñado puede probar su eficiencia en el enquistamiento de otras especies de amibas y/o servir de base para inducir el enquistamiento de otros protozoarios parásitos.

5.4 CONTRIBUCIONES

Se diseñó un nuevo medio de cultivo donde se formaron quistes que resisten el efecto de detergentes, observados en microscopio de luz son muy similares a los naturales y tienen una superficie lisa y refringente que sugiere la presencia de pared.

Por primera vez se logró formar una pared gruesa, electrodensa, visible con ME de transmisión.

Se determinó que no se requiere de extracto de hígado y páncreas, manitol, LCR, vitaminas ni solución amortiguadora de fosfatos de Sorensen para que se formen quistes de mejor calidad biológica que la de las ESQ y ESQR.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6.1 BIBLIOGRAFIA

Arroyo-Begovich, A., 1980, Carabez-Trejo, A. y De la Torre, M. Tinción de quistes de *Entamoeba invadens*, *Entamoeba histolytica*, y *Entamoeba coli* con aglutinina de germen de trigo marcadas con partículas de oro coloidal. Arch. Invest. Med. (Méx) 11 (suppl 1) 25-30 (1980).

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. (1980).

Bailey, G.B., Rengpien, S. Osmotic stress as a factor controlling encystation of *Entamoeba invadens*. Arch. Invest. Méd. (Méx) 11(supl. 1): 11 (1980).

Byers, J.T. Growth, reproduction, and differentiation in *Acanthamoeba*. Inv. Rev. Cytol. 61: 283-338 (1979).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Byers, J.T., Byeong, G.K., King, L.E. and Hugo, E.R. Molecular aspects of de cell cicle and encystment of *Acanthamoeba*. Reviews of infectious disease. 13(supl. 5):S378-84(1991).

Campos-Góngora, E. Efecto de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} en la síntesis de quitina de quistes de *E. histolytica* formados en condiciones axénicas. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. (1996).

Cassab GI. Abnormal cell form due to the absence of extensin of cell walls of boron deficient nodules. VI Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Biología Celular. (1995).

Ciba Geigy, S.A. Soluciones tampón o amortiguadoras En Tablas científicas, 6ª ed. Ciba Geigy, Basilea, Suiza. (1971) pp. 320-322.

Clark, G.C., Diamond, L.S. Pathogenicity, virulence and *Entamoeba histolytica*. Parasitology today 10: 46 (1994).

Diamond, L.S. Techniques of axenic cultivation of *E. histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae. J. Parasitol. 54:1056-1074 (1968).

Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C. A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72 (4):431-432 (1978).

Diamond, L.S. Cultivation of *Entamoeba histolytica*: A historical perspective. En

Kretschmer R.R. ed. Amebiasis: Infection and Diseases by *Entamoeba histolytica*.

Boca Raton, Flo: CRC Press Inc. USA. (1990) cap 2 : pp. 11-17.

Erlandesen, S.L., Bemrick, W.J., y Pawley, J. High- resolution electron microscopic

evidence for the filamentous estructura of the cyst wall in *Giardia lamblia* duodenalis

J. Parasitol. 75: 787-797 (1989).

Escamilla-Treviño, L.E. Biosíntesis de hormona del crecimiento humana recombinante

(HaHr). en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Tesis de maestría, Facultad de

medicina, UANL. (1996).

Farkas, V. Biosynthesis of cell wall of fungi. Microbiology Rev. 43 (suppl. 2): 117-144

(1979).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
Gutiérrez G. Investigaciones Mexicanas sobre vacunas. Amibiasis. Boletín mensual de

Epidemiología. 2 (11): 135-137 (1987)

García-Manzo, N.T., Escandon-Romero, C., Cabral-Soto, J., Escobedo-De La Peña, J.,

Olvera-Alvarez, J., Silva-Batalla, A. Patterns of the morbidity and mortality of

Amebiasis and amebic liver abscess in Mexico: An ecological analysis. Arch. of Med.

Research.; 28 (suppl): 290-292. (1997)

García- Zapien, A.G.,Hernández-Gutiérrez, R. And Mora-Galindo, J., Simultaneous growth and mass encystation of *Entamoeba invadens* under axenic conditions. Arch. of Med. Research. 26: 257-262 (1995).

Hendrix, C.D. Empirical Optimización in Research and Development. Reporte interno para Unión Carbide Corporation, South Charleston, West Virginia, U.S.A. (1970).

Jarrol, E.L., Manning, P., Lindmark, D.G., Coggings, J.R. y Erlandensen, S.L. Giardia cyst wall-specific carbohydrate: evidence for presence of galactosamine. Mol. Biochem. Parasitol. 32: 121-132 (1989).

John, D.T. Primary amebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. Ann. Rev. Microbiol. 36: 101-23. (1982).

López-Revilla, R., Rodríguez-Báez, J., Manual para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología, México. (1981).

Kadlec, V. The effects of some factors on the growgh and morphology of *Naegleria sp.* And three strains of the genus *Acantamoeba*. Folia-Parasitol-Praha. 22 (4): 317-321 (1975).

Maeda, H., e Ishida, N., Specificity of binding of hexapiranosyl polisaccharides with fluorecent brightener. J. Biochem. 62 (2): 276-278 (1967).

Macechko, P.T., Steimle, P.A., Lindmark D.G., Erlandsen, S.L., Jarroll, E.L. Galactosamine-synthesizing enzymes are induced when *Giardia* encyst. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56 (2): 301-309 (1992).

Martínez-Palomo, A. Parasitic amebas of the intestinal tract. En Kreier, J.P. y Baker, J.R. Ed. Parasitic Protozoa. Academic Press., San Diego, CA. (1993). cap 3: pp. 65-141.

Martínez-Palomo, A. Cell Biology, The cyst. En The Biology of *Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons. New York, N.Y. (1982). cap 2 pp. 56-59.

Mata-Cárdenas, B.D., Vargas-Villarreal, J., Morales-Vallarta, M. y Said-Fernández, S., PACSR: a serum replacement for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Trans. Trop. Med. Hyg.* 90: 584-585 (1996).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

McConnachie, E., The morphology, formation and development of cyst of *Entamoeba* *Parasitol.* 59: 41-53 (1969).

Mirelman D y Avron B, Cyst formation in *Entamoeba histolytica*. En Ravdin, J.I. Ed. Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. John Wiley y Sons. New York, N.Y. (1988). cap 47 pp 768-781.

Morales-Vallarta M, Villarreal-Treviño L, Ramírez-Bon E, Said-Fernández S and Mata-Cárdenas B. A method for encystation of *Entamoeba invadens* .Proc. Microscopy and Microanalysis: 916-917. 1995

Neff, R.J., Benton, W.F. Localization of cellulose in the cysts of *Acanthamoeba* sp.
J. Protozool. 9:11 (1962).

Page, W.J., Sadoff, H.L. Relations between calcium and uronic acids in the encistment of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 122 (1):145-151 (1975).

Petri, W.A., Jr. Recent advances in Amebiasis. Crit. Rev. in Clin. Lab. Sci. 33 (1):1-37 (1996).

Potter, J.L., Weisman. Cellulose synthesis by extract of *Acanthamoeba castellanii* during encystment. Biochem. Biophys. Acta.; 428: 240-252 (1976).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Rengpien S, Bailey GB. Differentiation of *Entamoeba*: A new medium and optimal conditions for axenic encystation of *Entamoeba invadens*. J Parasitol. 61:24 (1975).

Said-Fernandez, S., Vargas-Villarreal, J., Castro-Garza, J., Mata-Cardenas, B.D., Navarro-Marmolejo, L., Lozano-Garza, G., Martínez-Rodríguez, H. PEHPS medium: An alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*;82:249 (1988).

Said-Fernández, S., Mata-Cárdenas, B.D., González-Garza, M.T., Mora-Galindo, J., Ruiz-Ordoñez, J., Navarro-Marmolejo, L. Producción masiva de quistes inmaduros de *Entamoeba histolytica*. *Gac. Méd. Méx.* 126:307-313 (1990).

Said-Fernández, S., Mata-Cárdenas, B.D., González-Garza, M.T, Rodríguez-Pérez, E., Navarro-Marmolejo, L. *Entamoeba histolytica* cysts with a defective wall formed under axenic conditions. *Parasitol. Res.* 79:200 (1993).

Shavers, C.L., Parsons, M.L. and Deming, S.N. Simplex Optimization of Chemical Systems. *Journal of Chemical Education.* 56(5):307-309 (1979).
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Sykes, D.E., Band, R.N. Poliohenol oxidase produced during encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Protozool.* Aug; 32 (3):512-517 (1985).

Tomlinson, G. Y Jones, E.A. Isolation of cellulose from the cystwall soil amoeba. *Biochem. Biophys. Acta.* 63: 194-200 (1962).

Vazquezdelara-Cisneros, L.G., Arroyo-Bergovich, A. Induction of encystation of *Entamoeba invadens* by removal of glucose from the culture medium. *J Parasitol.* 70 (5): 629-633 (1984).

Walsh, J. A. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection In Rabdin, J.I. Amebiasis. John Wiley & Sons. Ed. New York. N.Y. (1988): pp. 93-105.

Weisman, R.A. Differentiation in *Acanthamoeba Castellani*. *Ann. Rev. Microbiol.*;30:189- 219 (1976).

WHO News and activities. *Bulletin of the World Health Organization.* 75 (3): 291-292 (1997).

Zhang, T. and Stanley, S.L. Progress in an oral vaccine for Amebiasis. Expresión of the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) in the avirulent vaccine strain *Salmonella typhi* TY2 χ 4297 (\blacktriangle *cya*, \blacktriangle *crp*, \blacktriangle *asd*): safety and immunogenicity in mice. *Arch. Med. Res.* 28 (Suppl.): S269-271 (1997).

