

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INCREMENTO DE LA SÍNTESIS DE QUITINA EN
QUISTES DE *Entamoeba histolytica* POR EFECTO
DE Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+}

POR

EDUARDO CAMPOS GONGORA

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

Julio, 1996

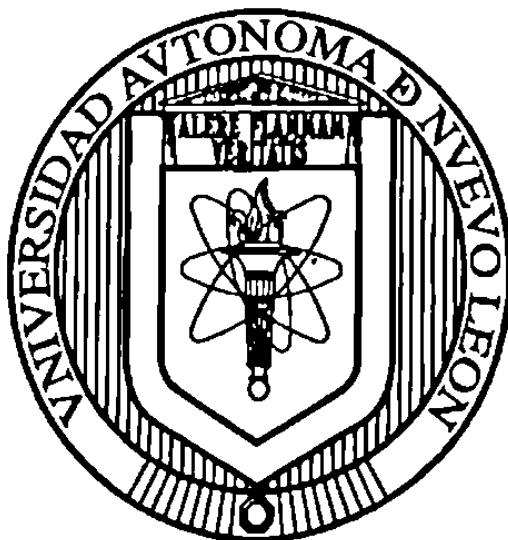
TM
RC121
.A5
C34
c.1



1080072446

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**INCREMENTO DE LA SINTESIS DE QUITINA EN
QUISTES DE *Entamoeba histolytica* POR EFECTO
DE Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+}**

POR

EDUARDO CAMPOS GONGORA

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

Julio, 1996

TM
RC121
.A5
C34

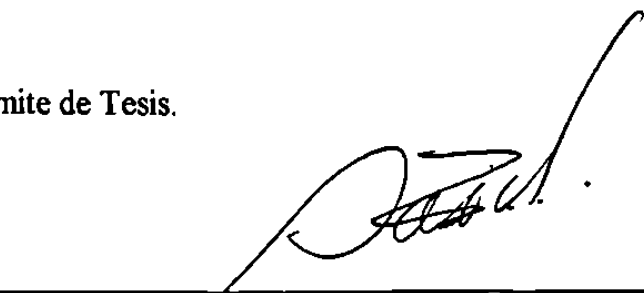


INCREMENTO DE LA SINTESIS DE QUITINA

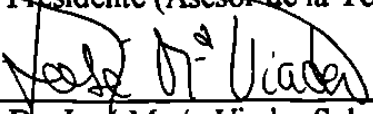
EN QUISTES DE *Entamoeba histolytica*

POR EFECTO DE Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+}


Aprobación por Comité de Tesis.



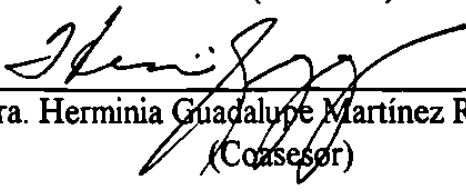
Dr. Salvador Said Fernández
Presidente (Asesor de la Tesis)



Dr. José María Viader Salvadó
Secretario (Coasesor)



Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta
Vocal (Coasesor)



Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
(Coasesor)



Dra. María Julia Verde Star
Subdirectora de Estudios de Postgrado

El presente trabajo se realizó en:

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

Laboratorio de Química Biomolecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UANL.

Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

División de Biología del Desarrollo, del Centro de Investigación Biomédica de Occidente: IMSS.

Director de Tesis:

Dr. Salvador Said Fernández

Asesores:

Dr. José María Viader Salvadó

Departamento de Bioquímica, Fac.de Medicina; UANL

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez

Departamento de Bioquímica, Fac. de Medicina; UANL

Dr. Mario R. Morales Vallarta

Departamento de Biología Celular, Fac. de C. Biológicas; UANL

Colaborador:

M. en C. Juan Mora Galindo

División de Biología del Desarrollo, CIBO:IMSS

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Salvador Said Fernández, por toda su ayuda, amistad, confianza y conocimientos transmitidos durante este pequeño espacio de tiempo, tiempo que ha dedicado a solucionar o enseñarnos a solucionar problemas de cualquier índole, siendo sus consejos eso que algunas veces necesitamos para volver a empezar cuando las cosas parecen ir mal; gracias por su amistad, Gracias por todo...

De la misma manera agradezco a los Drs. José María Viader Salvadó, Herminia G. Martínez Rodríguez y Mario R. Morales Vallarta por todos sus consejos y sugerencias para incrementar la calidad de este trabajo, por el tiempo dedicado a la solución de los problemas que se presentaron durante su realización y principalmente por el tiempo que dedicaron a escuchar y solucionar todas mis preguntas. Gracias por su amistad.

Al Departamento de Graduados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por todos los conocimientos adquiridos en sus aulas y laboratorios.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste:IMSS, por todo el apoyo y las facilidades otorgadas para realizar este trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Química Biomolecular del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UANL.

A la División de Biología del Desarrollo, Centro de Investigación Biomédica de Occidente:IMSS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 83953 otorgada para mis estudios de postgrado y por el apoyo otorgado para los proyectos M9212F328 y 264100-5-1379PM

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por los apoyos otorgados al proyecto SP0038-127

A todo el personal de la División de Biología Celular y Molecular del CIBIN por la ayuda brindada durante la realización de este trabajo.

A la QCB Celia Nohemí Sanchez Domínguez, por su ayuda en la realización de los análisis por CLAR.

Al M.C. Juan Mora Galindo, por su ayuda en los análisis de microscopía.

Al Dr. Antonio Luna de La Rosa y Francisco Treviño, por su arte gráfico en este trabajo y por su amistad.

Un agradecimiento especial para mi hermano Biol. Ricardo Zavala Góngora por que con su ayuda y compañía en todo momento, logra que las cosas difíciles se hagan fáciles.

A mi familia por el apoyo y estímulo que siempre me han brindado, particularmente a mi madre Sra. Sabina Góngora Cerecedo, a mi hermana y su esposo, por permitirme estar lejos de Ustedes.

En general a todas aquellas personas que de una u otra manera me brindaron su ayuda para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a la persona a quien debo todo lo que soy:

a mi madre:

Sabina Góngora Cerecedo

Quien con su esfuerzo, sus enseñanzas y sacrificando parte de su vida, ha sabido llevarnos por este camino.

“Aunque lejos de mi, siempre estás en mi corazón y pensamiento”

A mi esposa:

Vera González Hernández; por todo su amor, comprensión y apoyo, aún en los momentos difíciles.

A mis Hermanos:

Ricardo y Margarita; quienes han compartido toda su vida conmigo

A mi sobrina:

Saby Laura, por los pocos momentos que hemos estado juntos

A mis maestros

A mis familiares

A mis amigos

NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
AGT	Aglutinina de germen de trigo
cm	Centímetros
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
°C	Grados Celsius
EHP	Extracto de hígado y páncreas
g	Gramos
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GLU	Glucosa
[¹⁴ C]-glucosa	Glucosa radioactiva marcada con carbono 14
h	Horas
HCl	Acido clorhídrico
KOH	Hidróxido de potasio
l	Litro
lb/pulg ²	Libras por pulgada cuadrada
<i>M</i>	Concentración molar
mg	Miligramos
ME	Medio de enquistamiento (PEHPS suplementado con cationes)
ME20	ME Grupo 20 [PEHPS + MgCl ₂ (1.22 mM), MnCl ₂ (14.44 mM) y CoCl ₂ (19.44 mM)]
ME10	ME Grupo 10 [PEHPS + MgCl ₂ (4 mM), MnCl ₂ (10 mM) y CoCl ₂ (10 mM)]
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Concentración milimolar
mOsm/Kg	Miliosmoles por kilogramo

μg	Microgramos
μl	Microlitro
μm	Micrómetros
μM	Concentración micromolar
<i>N</i>	Concentración normal
NAG	N-acetil-D-glucosamina
nm	Nanómetros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PEHPS	Medio de cultivo para <i>E. histolytica</i>
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SSE	Solución salina de enquistamiento
u	Unidades enzimáticas
UDP	Difosfato de uridina
<u>X</u>	Concentración con respecto a la solución de trabajo

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Resistencia a SDS al 0.4% de quistes de <i>E. histolytica</i> formados en medio PEHPS suplementado con diferentes combinaciones de cationes	41
2. Eficiencia de enquistamiento de <i>E. histolytica</i> en medio ME20	43
3. Contenido de NAG y GLU en diferentes estadios de diferenciación de <i>E. histolytica</i> y en quistes de <i>E. invadens</i>	49

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.	Crecimiento de <i>E. histolytica</i> cepa HM-1-IMSS en medio PEHPS, utilizando lotes de EHP preparados en recipientes de aluminio o de polietileno 38
2.	Resistencia a choques hipoosmóticos y SDS de quistes de <i>E. histolytica</i> formados en PEHPS más 3 mM de MgCl ₂ , MnCl ₂ y CoCl ₂ . Medio con EHP preparado en recipiente de aluminio o de polietileno 39
3.	Contribución de Mg ²⁺ , Mg ²⁺ y Mn ²⁺ , y Mg ²⁺ , Mn ²⁺ y Co ²⁺ sobre la resistencia a concentraciones variables de SDS de quistes formados en medio PEHPS . 40
4.	Efecto de diferentes combinaciones de Mg ²⁺ , Mn ²⁺ y Co ²⁺ sobre la resistencia de quistes a diversos tratamientos. Combinaciones calculadas por medio del método Simplex Secuencial Básico 42
5.	Separación e identificación por CLAR de estándares de monosacáridos posibles componentes de pared 44
6.	Porcentaje de recuperación de NAG en función del tiempo de hidrólisis con HCl 11 N, a 40 °C, a partir de 2.5 mg de un estándar de NAG y de 5.0 mg de quitina de exoesqueleto de camarón 45
7.	Identificación por CLAR de los productos de hidrólisis ácida de los polisacáridos de las paredes de quistes de <i>E. histolytica</i> formados a) de manera espontánea en PEHPS, b) en PEHPS suplementado con cationes, de quistes de <i>E. invadens</i> formados en medio bajo en glucosa y del material de trofozoitos sedimentable a 700 x g, resistente a lavados sucesivos con HCl, NaOH y etanol 47
8.	Identificación de los productos de la hidrólisis de los polisacáridos de paredes de quistes por coinyección con estándares de NAG y GLU 48
9.	Efecto de quitinasa sobre la afinidad de los quistes de <i>E. histolytica</i> por el calcoflúor white M2R 50
10.	Destrucción de quistes de <i>E. histolytica</i> formados en medio PEHPS con cationes, por efecto de quitinasa, celulasa y lisozima 51
11.	Efecto de la incubación con quitinasa, celulasa y lisozima sobre los quistes de <i>E. histolytica</i> y su afinidad por el calcoflúor 52

Figura	Página
12. Afinidad de diferentes estadios de diferenciación de <i>E. histolytica</i> por AGT marcada con fluoresceína	54
13. Afinidad de los trofozoitos de <i>E. histolytica</i> por AGT marcada con fluoresceína	55
14. Paredes de quistes resistentes a 10 ciclos de sonicación y su afinidad por el calcoflúor white M2R	56
15. Aspecto de un quiste típico de <i>E. histolytica</i> formado en ME20	57

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
1 INTRODUCCION		
1.1	Amibiasis	1
1.2	Ciclo Biológico de <i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.3	Características de Trofozoitos y Quistes	2
1.4	Enquistamiento Axénico de <i>Entamoeba histolytica</i>	3
1.5	Estructura y Función de la Pared Quística	5
1.6	Descripción de Quistes de <i>E. histolytica</i> Formados en Condiciones Axénicas con Paredes Inmaduras o Anormales	7
1.7	Quitina Sintetas y Síntesis de Quitina en Hongos, Animales Pluricelulares y Amibas	9
1.8	Quitina Sintasa y Síntesis de Quitina en <i>E. invadens</i>	11
1.9	Hipótesis	12
1.10	Objetivos	12
	1.10.1 Objetivo General	12
	1.10.1 Objetivos Específicos	12
1.11	Secuencia del Trabajo Experimental	13
2 MATERIALES		
2.1	Origen de los Reactivos	14
2.2	Material Biológico	15
	2.2.1 Amibas	15
2.3	Preparación de los Medios de Cultivo	15
	2.3.1 Extracto de Hígado y Páncreas (EHP)	15
	2.3.2 Preparación del PEHPS	16
	2.3.3 Medio Basal Para Enquistamiento (MBE)	17
	2.3.4 Medio BI-S-33	17
	2.3.5 Medio LG (BIS sin glucosa)	18
2.4	Composición y Preparación de las Soluciones	19
	2.4.1 PBS	19
	2.4.2 MgCl ₂ , MnCl ₂ y CoCl ₂	19
	2.4.3 SSE	20
	2.4.2 Tris-HCl/NaCl + Ca, Mn y Mg	20
	2.4.5 Calcoflúor White M2R	21
	2.4.6 Solución Amortiguadora de Cacodilatos 0.1M	21

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
2.4.7	Glutaraldehido 2.5% 21
2.4.8	Fase Móvil para CLAR (H ₂ SO ₄ 0.5 mM) 21
2.5	Preparación de los Detergentes 22
2.5.1	Dodecilsulfato de Sodio (SDS) 22
2.5.2	N-Lauroilsarcosina (Sarkosyl) 22
2.6	Preparación de las Lectinas 22
2.6.1	Aglutinina de Germen de Trigo (AGT)-Fluoresceína 22
2.7	Preparación de las Enzimas 23
2.7.1	Quitinasa 23
2.7.2	Celulasa 23
2.7.3	Lisozima 23
2.8	Preparación de los Medios de Enquistamiento (ME) 23
3 METODOS	
3.1	Tratamiento del Material para el Cultivo de Amibas 24
3.1.1	Lavado del Material 24
3.1.2	Esterilización del Material 25
3.2	Cultivos Amibianos Axénicos 25
3.2.1	Curva de Crecimiento 25
3.2.2	Mantenimiento de las Cepas de Referencia 25
3.2.3	Crecimiento de <i>E. histolytica</i> en Medio Preparado en Presencia y Ausencia de Aluminio 26
3.3	Enquistamiento 26
3.3.1	Quistes de <i>E. histolytica</i> Formados en Medio PEHPS Envejecido 26
3.3.2	Quistes de <i>E. histolytica</i> en PEHPS Suplementado con Cationes 26
3.3.3	Quistes de <i>E. invadens</i> 27
3.4	Cosecha de Quistes o Trofozoítos 27
3.4.1	Obtención de Quistes o Trofozoítos en Cantidades Masivas. 27
3.5	Pruebas de Resistencia a Diferentes Concentraciones de SDS 28
3.6	Resistencia a SDS de Quistes de <i>E. histolytica</i> Formados en ME Preparado en Presencia y Ausencia de Aluminio 28
3.7	Efecto de Diferentes Combinaciones de Mg ²⁺ , Mn ²⁺ y Co ²⁺ Sobre la Resistencia de los Quistes a Diferentes Concentraciones de SDS 29
3.7.1	Descripción del Método Simplex Secuencial Básico 29

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
3.8	Análisis de los Componentes de Paredes de Quistes por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) 31
3.8.1	Determinación de los Tiempos de Retención de Estándares . . 31
3.8.2	Curvas Estándar de NAG y Glucosa 31
3.8.3	Obtención de Paredes de Quistes y Glicocalix de Trofozoítos . 32
3.8.4	Obtención de Polisacáridos de Pared y Oligosacáridos del Glicocalix 32
3.8.5	Hidrólisis ácida de quitina y NAG 33
3.8.6	Hidrólisis de Polisacáridos de Pared y Oligosacáridos del Glicocalix 34
3.8.7	Identificación y Cuantificación de los Productos de Hidrólisis Ácida de los polisacáridos de Pared de Quistes por CLAR . . 34
3.9	Microscopía de luz 35
3.9.1	Afinidad de las Paredes de los Quistes por Calcoflúor White M2R 35
3.9.2	Afinidad por AGT-Fluoresceína 35
3.10	Efecto de Quitinasa, Celulasa y Lisozima Sobre los Quistes de <i>E. histolytica</i> 36
4 RESULTADOS	
4.1	Estandarización de los Métodos de Cultivo 37
4.1.1	Crecimiento de <i>E. histolytica</i> en Medio Preparado con Lotes de EHP Cocido en Recipientes de Polietileno o de Aluminio 37
4.1.2	Resistencia a Choques Hipoosmóticos y a Detergentes de Quistes Formados en Medio PEHPS adicionado con 3 mM de Mg ²⁺ , Mn ²⁺ y Co ²⁺ 38
4.2	Requerimientos de Mg ²⁺ , Mn ²⁺ y Co ²⁺ 3 mM para la Formación de Quistes de <i>E. histolytica</i> Resistentes a SDS 39
4.3	Efecto de Diferentes Combinaciones de Mg ²⁺ , Mn ²⁺ y Co ²⁺ Sobre el Porcentaje de Quistes Resistentes a SDS 41
4.4	Análisis de los Polisacáridos de Pared de Quistes Formados en Medio de Enquistamiento Adicionado con ME20 44
4.4.1	Análisis de los Estándares por CLAR 44
4.4.2	Recuperación de NAG y NAG Proveniente de Quitina Hidrolizada 45

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
	4.4.3 Identificación y Cuantificación por CLAR de los Productos de Hidrólisis Ácida de los Polisacáridos	46
4.5	Dstrucción de Quistes Incubados en un Medio Hipotónico, en Presencia de Quitinasa	49
4.6	Afinidad de los Quistes por Calcoflúor y por AGT-Fluoresceína . . .	53
4.7	Aspecto de un Quiste Típico de <i>E. histolytica</i> Formado en ME20 . .	57
5	DISCUSION	
5.1	Discusión	58
5.2	Conclusiones	67
5.3	Perspectivas	67
5.4	Contribuciones del Presente Trabajo	68
	REFERENCIAS	69

RESUMEN

Eduardo Campos Góngora

Fecha de Graduación: Julio, 1996

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

**Título del Estudio: INCREMENTO DE LA SINTESIS DE QUITINA
EN QUISTES DE *Entamoeba histolytica* POR
EFECTO DE Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+}**

Número de páginas: 91

**Candidato para el Grado de Maestría
en Ciencias con especialidad en
Microbiología**

Area de Estudio: Microbiología Médica

Propósito y Método del Estudio: El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* consiste en una etapa de quiste y otra de trofozoíto. La biología celular y molecular de los quistes son poco conocidas. Esto se debe a la falta de un modelo *in vitro* que permita obtener cantidades masivas de quistes en condiciones axénicas. *E. invadens* posee una quitina sintasa dependiente de cationes divalentes. *E. histolytica* cultivada bajo condiciones axénicas en medio PEHPS es capaz de formar quistes viables, pero con una pared inmadura, la cual se destruye en presencia de SDS. En el presente trabajo, el medio PEHPS se suplementó con combinaciones diferentes de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} para estimular la síntesis de quitina. Los polisacáridos de los quistes obtenidos en el PEHPS suplementado con cationes se hidrolizaron y se analizaron por CLAR; también se analizó la afinidad de los quistes por la aglutinina de germen de trigo y por el calcoflúor y el efecto que sobre estos quistes tiene la quitinasa.

Contribuciones y Conclusiones: La adición al medio PEHPS con Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} produjo quistes más resistentes al efecto del SDS al 1%. En el análisis por CLAR se determinó la presencia de NAG y GLU en los hidrolizados de los polisacáridos de los quistes formados en PEHPS suplementado con cationes; la concentración de NAG y GLU fue mucho mayor en estos quistes que en trofozoítos y en quistes formados en medio PEHPS sin cationes adicionados. Los quistes formados en PEHPS suplementado con cationes tienen una fuerte afinidad por la aglutinina de germen de trigo y por calcoflúor, además, estos quistes son susceptibles al efecto de la quitinasa. Se concluye que una combinación adecuada de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} favorece la síntesis de quitina en quistes de *E. histolytica* formados en condiciones axénicas. La formación de quistes con paredes más resistentes a detergentes y con una mayor proporción de quitina, constituye un avance en la búsqueda de condiciones que favorezcan la producción masiva de quistes de *E. histolytica* en condiciones axénicas. Esto podría ser útil para analizar sistemáticamente el efecto de otros factores que favorezcan la formación masiva de quistes, lo más parecidos a los naturales que sea posible. Esto será de gran utilidad para conocer aspectos fundamentales de la diferenciación de este parásito patógeno del hombre.

Firma del Asesor:



Dr. Salvador Said Fernández.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Amibiasis

La amibiasis es una enfermedad causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. Esta enfermedad se caracteriza por la producción de lesiones, principalmente en el hígado y el colon de las personas infectadas.

La amibiasis constituye un importante problema de salud pública. Se estima que en el mundo hay 500 millones de personas infectadas; el 20% de ellas residen en el Continente Americano. En la última estimación global, se calculó que 10 millones de humanos padecían colitis o absceso hepático amibianos. Cada año la amibiasis es causa de muerte de unas 30,000 personas (Gutierrez G,1987).

1.2 Ciclo Biológico de *Entamoeba histolytica*

El ciclo de vida de *E. histolytica* consiste de cuatro etapas consecutivas, denominadas trofozoíto (forma vegetativa), prequiste, quiste (forma infectiva) y amiba metaquística (Martínez-Palomo A, 1982). Los trofozoítos son las formas vegetativas de la especie que nos ocupa y los responsables de las lesiones producidas en los órganos de los enfermos con amibiasis. Los quistes son las formas infectivas.

Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria en la luz del intestino humano, donde pueden vivir como comensales o invadir otros órganos y causar graves lesiones, principalmente en la pared del colon o en el hígado. Actualmente un numeroso grupo de investigadores acepta que existen dos especies de amibas, una patógena (*E. dysenteriae*)

y otra no patógena (*E. dispar*) (cf. ref. Diamond LS y Clark CG, 1993); o al menos que existen cepas de la misma especie que son patógenas o no patógenas (cf. ref. Diamond LS, 1992; Diamond LS y Clark CG, 1993). En condiciones adecuadas los trofozoítos se diferencian, convirtiéndose en prequistes, luego en quistes mononucleados y después de dos divisiones nucleares sucesivas en quistes maduros tetranucleados. Los quistes salen del intestino con las heces y llegan al intestino del nuevo hospedero cuando son ingeridos junto con alimentos o agua contaminados. En este sitio la pared quística es perforada y sale una sola amiba metaquística tetranucleada, la cual rápidamente se divide y produce ocho amibas mononucleadas pequeñas, que crecen rápidamente (Martínez-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. Por ejemplo, los quistes resisten el efecto de los jugos gástricos, enzimas pancreáticas y bilis, hipoosmolaridad y otras condiciones desfavorables. Esta resistencia les permite conservar su capacidad de infectar después de permanecer en heces, agua y 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 conocimientos sobre los quistes y el enquistamiento se han obtenido estudiando los quistes naturales aislados de heces, o de quistes formados en condiciones xénicas en las que una o varias especies microbianas condicionan el medio en el que se completa el ciclo biológico de *E. histolytica* (Martínez-Palomo A, 1982).

1.3 Características de Trofozoítos y Quistes

Algunas de las características de los quistes maduros y de los trofozoítos de *E. histolytica* más importantes para los fines de este proyecto son las siguientes (cf. ref. Martínez Palomo A, 1982):

Características generales de los quistes:

- a) Miden de 7-28 μm de diámetro.
- b) Son tetranucleados.
- c) Presentan una pared rígida, estratificada.
- d) Son resistentes a tratamientos con choques hipotónicos y con detergentes.
- e) Tienen una densidad menor que la de los trofozoítos.

Características generales de los trofozoítos:

- a) Tienen un diámetro entre 7 a 40 μm .
- b) Son células muy dinámicas y pleomórficas.
- c) Son altamente sensibles a cambios fisicoquímicos en el medio ambiente; como temperatura, humedad, pH, osmolaridad, potencial redox y concentración de O_2 y CO_2 .
- d) Crecen de preferencia adheridas al sustrato, aunque también pueden crecer en suspensión o aglutinarse.
- e) Bajo condiciones adversas, como las encontradas en cultivos viejos o a temperaturas menores a 36.5 °C, las amibas se redondean separándose de la superficie de cultivo o cesan de aglutinarse, mostrando poca actividad traslacional y movilidad interna.

1.4 Enquistamiento Axénico de *E. histolytica*

A partir de 1968, año en que Diamond describió el medio TPS-1 para el cultivo axénico de trofozoítos de *E. histolytica*, se ha avanzado mucho en el conocimiento de la Biología Celular y Molecular del trofozoíto, pero no puede decirse lo mismo sobre los quistes y su proceso de formación. Este tema de investigación ha quedado muy rezagado. Martínez Palomo, en 1982 expresó lo siguiente al respecto: *“La diferenciación de E. histolytica en quistes, incluyendo enquistamiento, multiplicación y desenquistamiento, permanece como uno de los últimos aspectos desconocidos de la biología del parásito. Considerando que el quiste es la forma resistente que capacita a E. histolytica para sobrevivir a condiciones adversas fuera del tracto intestinal y, por lo tanto, es*

responsable de la transmisión de la infección, es sorprendente como poca atención ha sido dada a esta cuestión particular". A la fecha esta afirmación sigue siendo válida (Martínez-Palomo A, 1993).

El principal obstáculo para estudiar adecuadamente los quistes y el enquistamiento de *E. histolytica* consiste en la falta de un medio y un método que permitan la producción de quistes de *E. histolytica* en cantidades suficientes y en condiciones axénicas (Martínez Palomo A, 1982, 1993 y Diamond LS, 1990). Ante esta situación, se han realizado numerosos estudios sobre el enquistamiento de *E. invadens* con la idea de reunir conocimientos que faciliten el desarrollo de un método para inducir el enquistamiento de *E. histolytica*. Sin embargo, a pesar de los avances que se han logrado con este enfoque, hasta ahora no ha sido posible desarrollar un método de enquistamiento para *E. histolytica*, que produzca quistes abundantes, con la resistencia a factores adversos, típica de los normales; aunque Said-Fernández y col. desarrollaron un medio donde se favorece el enquistamiento, éste todavía tiene muchas limitaciones, como se verá más adelante (Said-Fernández y col. 1988; 1993).

Ante la dificultad de obtener quistes de *E. histolytica* en cultivos axénicos, la mayoría de los investigadores interesados han enfocado sus esfuerzos a estudiar el proceso de enquistamiento en *E. invadens*: una especie cercana a *E. histolytica*, desde el punto de vista filogenético (cf. ref. Martínez-Palomo, 1993). Sin embargo los datos obtenidos al respecto no son claramente extrapolables a *E. histolytica*.

De acuerdo con lo anterior, posiblemente la forma más rápida y segura de crear las condiciones adecuadas para investigar la Biología Celular y Molecular de la forma infectiva y del enquistamiento de *E. histolytica* es desarrollar un método de enquistamiento especial para *E. histolytica* (Martínez-Palomo A, 1993; Diamond LS, 1990).

1.5 Estructura y Función de la Pared Quística

Los quistes poseen pared, los trofozoitos no. La pared constituye uno de los organelos más importantes de los quistes porque les confiere su resistencia y forma característica. Los elementos moleculares de las paredes quísticas son completamente diferentes a los que se encuentran en la membrana plasmática de los trofozoitos y por lo tanto su aparición en la superficie de las amibas es fácilmente identificable e indicativo de un proceso de diferenciación.

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 sustancias tóxicas (Neff RJ., 1962; Arroyo-Begovich A, 1980).

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 mencionadas en el párrafo precedente. Pero además, se sabe que los estratos fibrilares polisacarídicos 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 (Neff RJ, 1962; Potter JL, Weisman 1976; Tomlinson G y Jones EA, 1962). En cambio, la composición química de las amibas del género *Entamoeba* no se ha esclarecido del todo, pero se han hecho importantes hallazgos al respecto: McConnachie (McConacchie E, 1969) identificó en la pared quística de *E. invadens* un complejo proteína-carbohidrato. Arroyo-Begovich y col. informaron que el componente mayoritario de la pared de quistes de *E. invadens* es quitina (Arroyo-Begovich, Carabez-Trejo y Ruíz- Herrera, 1978). 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* constituyen una tercera posibilidad: se ha propuesto que éstos no tienen ni quitina ni celulosa como componentes mayoritarios, sino un polisacárido aún no identificado compuesto por galactosamina, sola o en combinación con otros carbohidratos. Esta estructura puede existir como polisacárido, glicoproteína, proteoglicano o glicolípido (Jarrol y col., 1989; Erlandesen y col., 1989).

Arroyo-Begovich y Carabez-Trejo (1980), observaron que las paredes de *E. invadens* tienen una fuerte afinidad por aglutinina de germen de trigo. Esta lectina reconoce específicamente secuencias de β (1 \rightarrow 4) N-acetilglucosamina. La cantidad de lectina que se une a las paredes de los quistes es proporcional a la cantidad y longitud de secuencias de N-acetilglucosamina.

Las paredes de quistes de *E. histolytica* y de *E. coli* también muestran afinidad por la aglutinina de germen de trigo, pero notablemente menor que la de las paredes de *E. invadens*. Lo cual sugiere que estas estructuras también poseen secuencias de N-acetilglucosamina, aunque aparentemente de menor longitud y en menor cantidad que las paredes de *E. invadens* (Arroyo-Begovich y Carabez-Trejo, 1980) y que posiblemente pequeñas secuencias de β (1 \rightarrow 4) poli-N-acetilglucosamina forman parte de

polisacáridos estructuralmente más complejos que la quitina; o bien, que la quitina de la pared quística de *E. histolytica* y *E. coli* es menos accesible a la aglutinina de germen de trigo que la quitina de la pared de *E. invadens*; posiblemente por estar parcialmente cubierta por otro componente de pared. Este compuesto podría ser otro polisacárido, toda vez que los quistes de estas especies muestran una gran afinidad por calcoflúor white M2R, y este colorante se une específicamente a todos los polisacáridos que tienen hexapiranosas en configuración β (1 \rightarrow 4) (Maeda H e Ishida N, 1967).

Las paredes de los quistes de *E. invadens* formados en condiciones axénicas resisten el efecto del dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1% (Arroyo-Begovich y Carabez-Trejo (1980), posiblemente debido a entrecruzamientos entre fibras de quitina largas y cortas.

1.6 Descripción de Quistes de *E. histolytica* Formados en Condiciones Axénicas con Paredes Inmaduras o Anormales

Said-Fernández y col. describieron el medio PEHPS para el cultivo axénico de amibas del género Entamoeba (Said-Fernández y col., 1988) y encontraron que en este medio las cepas HK9 y HM-1 de *E. histolytica* forman quistes maduros, pero con una pared anormal o inmadura (Said-Fernández y col., 1993). Proponen que esta pared es anormal o inmadura porque los quistes mueren cuando se les coloca en agua bidestilada o sarkosyl al 0.1%; lo cual es inocuo para quistes naturales de *E. histolytica* o quistes axénicos de *E. invadens*. En ese mismo trabajo se encontró 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 quistes tetranucleados, maduros, cuya apariencia al microscopio es indistinguible de la de los quistes naturales cuando ambos son teñidos con el método de Gomori.

Tanto los quistes naturales como los formados en condiciones axénicas de *E. histolytica* tienen afinidad por calcoflúor white M2R. Además, los quistes naturales

unen a su superficie gamma-globulinas específicas contra quistes formados en condiciones axénicas. En cambio los trofozoítos no muestran afinidad por estos anticuerpos. El primer hallazgo indica que los quistes formados en condiciones axénicas también tienen hexapiranosas en configuración β (1 \rightarrow 4), como los quistes naturales. La segunda observación es evidencia de que los quistes naturales comparten antígenos de pared que no existen en los trofozoítos.

Cuando los quistes formados en condiciones axénicas se someten a choques hipotónicos (55 mOsm/Kg) y luego se reincuban en condiciones adecuadas, se observan trofozoítos después de 1 a 7 días en algunos de los tubos tratados. Estos trofozoítos crecen hasta llenar los tubos. Esto sugiere que esta pared inmadura, o defectuosa sí confiere resistencia a los quistes contra choques hipotónicos, pero en forma parcial. Por otro lado, las amibas incorporan [14 C]-glucosa a material insoluble en KOH-HCl-etanol en función del tiempo de incubación, en un medio al cual no se añade glucosa no radiactiva. Este material conserva su afinidad por el calcoflúor white M2R.

Cuando los quistes de *E. histolytica* obtenidos 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-Fernández y col., 1993). Todas estas observaciones sugieren fuertemente que *E. histolytica* es capaz de sintetizar durante el enquistamiento una hexapiranosas con configuración β (1 \rightarrow 4), en condiciones axénicas (Maeda H. e Ishida N., 1967). La eficiencia de formación de estos quistes en condiciones axénicas es de 2.1% con respecto a la población original, antes de iniciarse el enquistamiento (Said-Fernández y col., 1993).

Los datos preliminares reunidos por el grupo de Said-Fernández sobre la pared de *E. histolytica* sugieren que la composición química y la organización estructural de la pared quística de *E. histolytica* es parecida a la de otros protozoarios como *E. invadens* (Arroyo-Begovich y col., 1980) *Acanthamoeba castellanii* (Neff RJ, 1962) y *Giardia lamblia* (Potter JL Weisman, 1976 y Erlandesen SL, 1989).

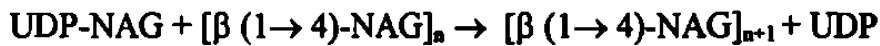
Por medio de espectrofotometría de absorción atómica (QBP Miguel Angel Zuñiga Charles, datos no publicados), se determinó la concentración de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} en los medios PEHPS y TYI-S-33 (Diamond LS, 1978); se encontró que la concentración de Mn^{2+} y Mg^{2+} es mayor 1.6 y 3.38 veces, respectivamente, en el medio PEHPS que en el medio TYI-S-33. Las concentraciones encontradas en el PEHPS fueron 3.15 y 798 μM de Mn^{2+} y Mg^{2+} , respectivamente, mientras que en el medio TYI-S-33 los valores correspondientes fueron: 2.0 y 236 μM . Por otra parte, la cantidad de Co^{2+} fue 0.72 veces mayor en el TYI-S-33 que en el PEHPS con valores de 0.72 y 0.52 μM , respectivamente. Posiblemente el medio PEHPS favorece la síntesis de quitina debido a que contiene una concentración mayor de Mg^{2+} y de Mn^{2+} , pero esta síntesis es defectuosa debido a la baja concentración de Co^{2+} .

Algunos experimentos preliminares han mostrado que los quistes de *E. histolytica* formados en el 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 $CoCl_2$, $MgCl_2$ y $MnCl_2$. Por todo esto, en los siguientes párrafos el análisis se enfocará a la quitina y su síntesis en diversas especies unicelulares y pluricelulares.

1.7 Quitina Sintetas y Síntesis de Quitina en Hongos, Animales Pluricelulares y Amibas

Glaser y Brown encontraron que una preparación enzimática del hongo *Neurospora crassa* cataliza la incorporación de unidades de N-acetilglucosamina (NAG), usando como sustrato 5' difosfato de uridina (UDP)-NAG en un polímero indistinguible de la quitina auténtica (Glaser L y Brown DH, 1957).

La ecuación general para la reacción de síntesis de quitina es la siguiente:



La reacción requiere la presencia de los cationes divalentes Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} como cofactores. La enzima UDP-2 acetamido 2-deoxi-D-glucosaquitina 4- β -acetamidodeoxiglucosil transferasa, conocida también con el nombre de quitina sintasa cataliza esta reacción. (Horst MN, 1981).

Numerosos estudios con extractos libres de células de diversas especies de hongos han mostrado que la mayor actividad específica de la quitina sintasa está presente en la fracción microsomal; la cual es una fracción subcelular particulada (cf. ref. Farkas V, 1979).

Se han obtenido preparaciones particuladas de la quitina sintasa en diversas especies de hongos (cf. ref. Farkas V, 1979) y los resultados indican que esta enzima es alostérica y que tiene más de un sitio de enlace por molécula (McMurrugh I y Bartnicki-García S, 1971).

La síntesis de quitina en *Saccharomyces cerevisiae* (Kang y col., 1984) parece ser el resultado de la actividad de tres enzimas conocidas como quitina sintasa I, II y III. Las dos últimas se detectaron recientemente (Bulawa y col., 1986; Cabib y col., 1989; Orlean P, 1987; Bulawa y col., 1990; Sburlati A y Cabib E, 1986; Silverman y col., 1988).

También se ha encontrado quitina sintasa en animales pluricelulares que poseen quitina en el ectodermo o el exoesqueleto, como gusanos (Dubinsky y col., 1986) y crustáceos (Horst MN, 1981), respectivamente.

1.8 Quitina Sintasa y Síntesis de Quitina en *E. invadens*

Das, S. y Gillin, F.D. demostraron la presencia de dos formas de quitina sintasa en *E. invadens*: una forma soluble y una forma particulada, y sugirieron que esta enzima podría ser esencial para la formación de la pared quística de la especie mencionada (Das, S. y Gillin, FD, 1991). El 60% de la actividad enzimática de la quitina sintasa de *E. invadens* está en el sobrenadante de alta velocidad (quitina sintasa soluble), presenta su mayor actividad a pH 6.0. El 40% restante se encuentra en forma particulada y tiene actividad a pH entre 7.0 y 7.5. La actividad de ambas fracciones depende de la presencia de Mn^{2+} o Mn^{2+} y Co^{2+} (Das, S. y Gillin, FD, 1991).

Ninguna de las formas de la quitina sintasa, particulada o soluble, de *E. invadens* se activa con tripsina, lo cual indica que no se encuentran en forma de zimógeno. La actividad enzimática de la quitina sintasa es inhibida por UDP, UDP- glucosa y UDP-GalNAc, pero no por Polioxina-D o Nikkomicina (Das, S. y Gillin, FD, 1991).

De los antecedentes expuestos, los más estrechamente relacionados con el presente trabajo son los siguientes:

- (a) La resistencia de la pared de los quistes de varias especies de protozoarios se debe a la matriz de polisacáridos que contienen.
- (b) *Entamoeba histolytica* es capaz de formar quistes en condiciones axénicas cuando se cultiva en medio PEHPS, pero estos quistes tienen una pared anormal o inmadura.
- (c) Estas paredes contienen polisacáridos, pero no ofrecen la resistencia de los quistes naturales; probablemente por una síntesis o una maduración defectuosa de quitina.
- (d) Las quitina sintasas de otras especies son dependientes de cationes divalentes.
- (e) La concentración de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} es mayor en el medio PEHPS comparada con la de TY-I-S-33.

1.9 Hipótesis

Una combinación apropiada de Mg^{2+} , Mn^{2+} y/o Co^{2+} adicionada al medio PEHPS, favorece la síntesis de quitina en la pared de quistes de E. histolytica formados en condiciones axénicas.

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivo General.

Incrementar la síntesis de quitina y la resistencia de las paredes de quistes de E. histolytica formados en condiciones axénicas.

1.10.2 Objetivos Específicos.

- 1).- Estandarizar el método de enquistamiento de *E. histolytica* en condiciones axénicas, utilizando al PEHPS como medio básico.
- 2).-Analizar el efecto del Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} sobre la calidad de los quistes maduros formados en condiciones axénicas, juzgada por su resistencia a 1% de SDS y su afinidad por la aglutinina de germen de trigo.
- 3).-Identificar y cuantificar los polisacáridos de la pared y de los productos de su hidrólisis de quistes formados en PEHPS adicionado o no con cationes.

1.11 Secuencia del Trabajo Experimental

El proyecto se dividió en las siguientes tres fases:

- I. Estandarización de las técnicas de cultivo para obtener el mayor porcentaje de quistes resistentes a la concentración más alta posible de SDS (meta: resistencia al efecto de SDS al 1%).
- II. Identificación de los productos de hidrólisis ácida de los polisacáridos de pared de quistes de *E. histolytica* formados en condiciones axénicas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).
- III. Análisis de la estructura de la pared de quistes de *E. histolytica* formados axénicamente en medio PEHPS, mediante microscopía de luz incluyendo el análisis de la afinidad de las paredes quísticas por la aglutinina de germen de trigo.

CAPITULO 2

MATERIALES

2.1 Origen de los Reactivos

Sigma Chem Co. (St. Louis Mo., USA): ácido ascórbico, azida de sodio, L-cisteína, dodecilsulfato de sodio, N-lauroil sarcosina, trizma.HCl, cloruro de magnesio, cloruro de manganeso, cloruro de cobalto, cloruro de calcio, AGT marcada con isotiocianato de fluoresceína, D-(+)-glucosa, glucosa grado HPLC, quitina de exoesqueleto de camarón, quitinasa, celulasa, lisozima, ácido cacodílico, calcoflúor.

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

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

Reactivos Monterrey: hidróxido de potasio, fosfato dibásico de potasio, fosfato monobásico de potasio, ácido clorhídrico, cloruro de calcio, urea, hidróxido de sodio, carbonato de potasio.

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

Técnica Química (México): cloruro de potasio.

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

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

2.2 Material Biológico

2.1.1 Amibas.

Para este trabajo se utilizaron las cepas HM-1:IMSS de *E. histolytica* (Diamond LS, 1968), mantenida en condiciones axénicas (Said-Fernández y col., 1988) en este laboratorio por 16 años y la cepa IP de *E. invadens*, la cual fue gentilmente donada por el M.C. Juan Mora Galindo del CIBO: IMSS Guadalajara, Jal.

2.3 Preparación de los Medios de Cultivo

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

Preparación y almacenamiento. 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 limpió de tejido conectivo y se lavó con NaCl al 0.85%. Se cortó en trozos pequeños; los trozos se molieron con un molino eléctrico (Tor-Rey, Monterrey, N.L. México) y el producto se licuó 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 retiró el sobrenadante con un colador y se filtró a través de ocho gasas superpuestas. El producto se mezcló con tierra de diatomeas (250 ml de tierra blanca, Hiflo Estándar/litro de extracto) y 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 PEHPS (Said-Fernández y col., 1988).

Composición del Medio:

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. 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. Mex.), o de 350 ml, en frascos para cultivo en suspensión de 500 ml ("Spinners", Bellco Glass Inc. Vineland, NJ, USA). Los tubos se esterilizaron en autoclave, a 121 °C por 15 min. Los tapones de los tubos se dejaron flojos para esterilizarlos y se apretaron inmediatamente después. El medio se almacenó a temperatura ambiente hasta el momento de su uso.

Preparación y adición de suero. El suero bovino se descomplementó por calentamiento a 56 °C por 30 min. Se distribuyó en volúmenes de 40 ó 100 ml en botellas estériles de borosilicato con tapón de rosca. Después, se inoculó 1 ml de suero de cada

botella en 10 ml de medio PEHP y se incubó por 3 días para comprobar su esterilidad. Luego se almacenó a -20 °C. hasta el momento de usarlo.

A cada tubo con 10 ml de medio se le añadió 1 ml de suero descomplementado, en condiciones asépticas. A los spinners con 350 ml de medio se le agregaron 35 ml de suero.

2.3.3 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.

2.3.4 Medio BI-S-33 (Rengpien S y Bailey GB, 1975).

Composición.

Peptona Biotriptasa.....	40 g
Glucosa.....	10 g
NaCl	2.7 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
L-cisteína.....	1 g
Acido ascórbico.....	0.6 g
Citrato férrico de amonio.....	228 mg.
Agua desionizada c,b,p.....	900 ml

Preparación: los componentes se disolvieron con agua desionizada, por agitación magnética. El pH se ajustó a 7.0 con NaOH 10 N. Se comprobó que la osmolaridad del medio estuviera entre 300 y 330 mOsm/Kg con un osmómetro (Micro Osmometer Model 3MO Plus; ADVANCED INSTRUMENTS, INC. Norwood, MA. USA) y se aforó a 900 ml con agua desionizada. El medio se distribuyó en alícuotas de 10 ó de 80 ml, en

tubos de cultivo o en frascos cónicos de 125 ml (Bellco Glass Inc. Vineland, NJ, USA). Los tubos o frascos se esterilizaron en autoclave y se almacenó como se hizo con el medio PEHPS.

Inmediatamente antes de usarse se agregó a cada tubo o botella con medio, 10% de suero de bovino.

2.3.5 Medio LG: BIS sin Glucosa (Vázquezdelara-Cisneros y Arroyo-Begovich, 1984).

El medio LG (*Low Glucose*) se preparó de la misma manera que el BI-S-33, sólo que al LG no se le añadió glucosa y se usó suero dializado en vez de suero normal.

Para su preparación los reactivos se disolvieron en agua desionizada. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N. Se determinó la osmolaridad (300 a 330 mOsm/Kg). Se aforó al volumen deseado y se esterilizó por filtración. Para este último paso se usaron filtros con poros de 0.22 μm (Millipore, Bedford MA. USA). El medio LG se distribuyó en alícuotas de 50 ml y se almacenó a 4 °C.

Dialisis del suero. De un rollo de membrana de colodión para diálisis (Curtin Matheson Scientific) se cortaron 2 m aproximadamente. La membrana se hirvió por 15 min en un vaso de precipitado que contenía una cucharada de carbonato de sodio disuelto en un litro de agua bidestilada. Después, la membrana se lavó cuatro veces con agua desionizada y una vez con azida de sodio al 0.2%, y se almacenó en un frasco de boca ancha con tapón de rosca a 4 °C, lleno con la solución de azida de sodio que se usó para el último lavado. De la preparación anterior se tomó un trozo de 30 cm aproximadamente. Se ató por uno de sus extremos y se llenó con suero (aproximadamente 100 ml) hasta ocupar 3/4 de su capacidad. Se anudó su extremo superior, dejando turgente la pared del cilindro formado, cuidando de que quedase una burbuja de aire adentro, de cuando menos la cuarta parte del volumen que ocupaba el

suero. El cilindro se colocó en un vaso de precipitado de 4 l con agua desionizada. El conjunto se dejó en agitación magnética a 4 °C por 24 h, con cambios de agua cada 8 h.

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).

2.4.1 Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS).

Composición:

NaCl.....	6.5 g
K ₂ HPO ₄	2.8 g
KH ₂ PO ₄	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.

2.4.2 Soluciones de MgCl₂, MnCl₂, CoCl₂.

Las diferentes concentraciones de las soluciones de MgCl₂, MnCl₂ y CoCl₂ que se probaron en este trabajo se calcularon por medio del método de optimización autodirigida Simplex Secuencial Básico (Hendrix CD, Union Carbide, 1970; Shavers CL, Parsons ML y Deming SN., 1979). Para su preparación se usaron cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂·6H₂O), cloruro de manganeso tetrahidratado (MnCl₂·4H₂O), y cloruro de cobalto heptahidratado (CoCl₂·7H₂O).

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 deionizada y luego cada solución se aforó a 100 ml y se esterilizó en autoclave. Estas soluciones se usaron antes de 48 h de haber sido preparadas.

2.4.3 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, se aforó a 100 ml y se esterilizó por filtración. La solución se guardó a temperatura ambiente en botellas de borosilicato de 125 ml con tapón de rosca. Esta solución se usó antes de 48 h de preparada.

2.4.4 Solución Amortiguadora de Tris.HCl + Cationes.

(Tris.HCl 20 mM en 0.15 M de NaCl, 1mM de MnCl₂, 1mM de MgCl₂ y 1mM de CaCl₂).

Solución a:

Trizma.HCl.....	0.316 g
NaCl.....	0.88 mg

Los componentes se disolvieron en agua desionizada y se ajustó el pH a 7.0.

Solución b:

CaCl ₂	11 mg
MnCl ₂	19.79 mg
MgCl ₂	9.52 mg

Los componentes se disolvieron en unos 80 ml de la solución a y se aforó a 100 ml con la misma solución a.

2.4.5 Calcoflúor White M2R 0.01%.

Se disolvió 1 mg de calcoflúor white M2R en 10 ml de PBS. La solución se colocó en un tubo de ensayo con tapón de rosca y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

2.4.6 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 y se aforó a 100 ml con agua desionizada. La solución se esterilizó por filtración y se guardó a 4 °C hasta su uso.

2.4.7 Solución de Glutaraldehído.

El contenido de una ampolleta 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, 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.

2.4.8 Solución de H₂SO₄ 5 mM (Fase Móvil para CLAR).

Se diluyeron 0.14 ml de H₂SO₄ concentrado (Sigma, grado HPLC) en agua purificada con el sistema milli Q (Milli Q™, Water System, Millipore). Se aforó a 500 ml con agua; se filtró con un filtro de 0.45 μm (HVLP, Millipore) y se desgasificó por vacío, con agitación magnética, por 15 min.

2.5 Preparación de los Detergentes

2.5.1 Dodecilsulfato de Sodio (SDS).

Solución madre. Se disolvieron 2 g de dodecilsulfato de sodio en agua desionizada. La solución se aforó a 100 ml y se almacenó a temperatura ambiente, en un frasco de vidrio con tapón de rosca.

Soluciones de trabajo. A partir de la solución madre se prepararon las siguientes concentraciones de SDS: 0.0%, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 y 1.0%. De cada dilución se preparó un volumen de 3 ml, inmediatamente antes de usarla.

2.5.2 Sarkosyl al 0.2%.

Se disolvieron 0.2 g de la sal de sodio N-Lauroil sarcosina ($C_{15}H_{28}NO_3Na$) 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 Lectinas

2.6.1 AGT Marcada con Isotiocianato de Fluoresceína.

Se disolvieron 5 mg de AGT marcada (Sigma) en 1 ml de agua bidestilada (solución madre). De la solución madre se diluyeron 500 μ l con 5 ml de solución amortiguadora de Tris.HCl 20 mM (Tris.HCl 20 mM en 0.15 M de NaCl, 1mM de $MnCl_2$, 1mM de $MgCl_2$ y 1mM de $CaCl_2$, pH 7.0).

2.7 Preparación de las Enzimas

2.7.1 Preparación de Quitinasa.

El contenido de un frasco con 25 unidades de quitinasa de *Streptomyces griseus* (Sigma, Chemical Co.) se disolvió con 2 ml de PBS (PBS 50 mM, pH 6.0). De esta solución se tomaron 800 µl y se agregaron a un tubo eppendorf que contenía 200 µl de la muestra de quistes.

2.7.2 Preparación de Celulasa.

Se disolvieron 100 mg de celulasa de *Penicillium funiculosum* (10 unidades/mg de sólido), en 2 ml de PBS 50 mM, pH 5.0. De esta solución se tomaron 800 µl y se agregaron a un tubo eppendorf que contenía 200 µl de la muestra de quistes.

2.7.3 Preparación de Lisozima.

Se disolvieron 0.1 mg de lisozima de huevo de gallina (39,500 unidades/mg de sólido) en 2 ml de PBS 100 mM, pH 6.5. Se tomaron 800 µl y se agregaron a un tubo eppendorf que contenía 200 µl de la muestra de quistes.

2.8 Preparación de los Medios de Enquistamiento (ME)

A cada tubo conteniendo 7 ml de medio basal de enquistamiento (MBE) se le agregó 1 ml de cada una de las siguientes soluciones: suero de bovino (Sigma), solución salina de enquistamiento (SSE), y soluciones a concentraciones variables de MnCl₂, MgCl₂ y CoCl₂ (estas 3 últimas se prepararon a una concentración 12 veces mayor que la deseada, para que al mezclarse con el medio quedara a la concentración de trabajo). Al final se tenían 12 ml de medio de enquistamiento en cada tubo. De cada grupo de tubos de ME se preparó un tubo más para certificar la osmolaridad (300-330 mOsm/kg).

CAPITULO 3

METODOS

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 y col., 1988)

3.2.1 Curva de Crecimiento.

Se inocularon 30 tubos de cultivo con 1×10^3 amibas/ml y se incubaron a 37 °C. A las 24, 48, 72, 96 y 120 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 homogenizó por inversión suave del tubo (5 a 6 veces) y se determinó la densidad celular en un hematocitómetro.

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

Entamoeba invadens, cepa IP-1. Esta cepa se cultivó en medio BI-S-33. Las resiembras se realizaron cada 7 días (segundo tercio de su fase logarítmica de crecimiento). El inóculo fue de 4×10^4 trofozoítos/ml y la incubación se realizó a temperatura ambiente; el procedimiento de resiembra fue el mismo que para *E. histolytica*.

3.2.3 Crecimiento de *E. histolytica* en Medio Preparado en Presencia y en Ausencia de Aluminio.

Se realizaron curvas de crecimiento de la cepa HM-1:IMSS en PEHPS elaborado con: a) EHP cocido directamente en una olla de aluminio o b) EHP cocido en un vaso de polietileno, dentro de la misma olla. Los resultados se compararon mediante un análisis estadístico usando una prueba “t” de Student.

3.3 Enquistamiento

3.3.1 Quistes de *E. histolytica* Formados en Medio PEHPS Envejecido (QE).

Los QE 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 Quistes de *E. histolytica* en PEHPS Suplementado con Cationes (QM).

A los cultivos de *E. histolytica* en fase logarítmica de crecimiento (3 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, trasvasando directamente de un tubo a otro. Estos cultivos se incubaron a 37 °C por 7 días. Los quistes se cosecharon y se determinó su resistencia a

diferentes concentraciones de SDS. Mediante el procedimiento descrito también se obtuvieron quistes para el análisis con el microscopio de luz y electrónico, o para obtener biomasa para análisis por CLAR.

3.3.3 Quistes de *E. invadens* (Vázquezdelara-Cisneros y Arroyo-Begovich, 1984).

Se usaron trofozoítos de la cepa de referencia, creciendo en fase exponencial (7 días de incubación). Se inocularon 5×10^5 trofozoítos/ml en medio LG, se incubaron durante 48 h a temperatura ambiente, se cosecharon y se liofilizaron.

3.4 Cosecha de Quistes o Trofozoítos

Los cultivos de quistes o trofozoítos 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 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 pruebas de resistencia a SDS).

3.4.1 Obtención de Quistes o Trofozoítos en Cantidades Masivas.

Para la obtención de biomasa de trofozoítos de *E. histolytica* se hicieron cultivos en suspensión. En spinners de 500 ml que contenían 300 ml de medio PEHPS se inocularon 4×10^3 trofozoítos/ml y se incubaron a 37°C durante 24 h, en condiciones estáticas. Después se incubaron durante 48 h con agitación magnética, en un baño de agua con temperatura controlada y motor fuera de borda. Los cultivos se cosecharon, se lavaron con PBS y se liofilizaron (cuando se requirió la biomasa para análisis de composición de pared) o se procesaron inmediatamente (para ser analizados mediante microscopía).

Los quistes empleados para analizar la composición de polisacáridos de pared se colocaron en ampollitas de vidrio, donde se liofilizaron. Las ampollitas se sellaron con

flama, al vacío y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Para los análisis se prepararon cuatro lotes de quistes liofilizados.

3.5 Pruebas de Resistencia a Diferentes Concentraciones de SDS

En tubos eppendorf (eppendorf™ Sigma Chemical Co. St. Louis, MO; USA) de 1.8 ml de capacidad se colocaron 200 µl de una suspensión de quistes recién cosechados. Se determinó su densidad celular y a cada tubo se le agregaron 200 µl de SDS a las concentraciones indicadas (de 0.0 a 1.0%). Las mezclas de ensayo se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min y se determinó el número de quistes que al microscopio de luz se observaban íntegros. Con estos datos se calculó el porcentaje de quistes resistentes a cada concentración de SDS, con respecto a la densidad inicial, antes de mezclarlos con SDS y con respecto a la población original, antes de cambiar los cultivos del medio PEHPS al ME.

3.6 Resistencia a SDS de Quistes de *E. histolytica* Formados en ME, Preparado en Presencia y Ausencia de Aluminio

Con el fin de estandarizar el método de enquistamiento de *E. histolytica* se comparó la resistencia de los quistes formados en ME preparado con lotes de EHP cocido en una olla de aluminio o en un vaso de precipitado, como se indicó anteriormente (2.3.1), estos lotes de extracto se usaron para la preparación del medio basal. Utilizando cada lote de EHP preparado en presencia o ausencia de aluminio se prepararon sendos grupos de 10 tubos cada uno de ME suplementado con SSE y 3 mM de MgCl₂, MnCl₂ y CoCl₂ (como se hizo para obtener quistes de *E. histolytica* en ME suplementado con cationes). Con cada uno de estos grupos de medio se obtuvieron quistes y se determinó el porcentaje de ellos que era resistente a SDS al 0.4% , como ya se describió.

Se realizaron 3 ensayos independientes y los resultados de cada grupo se compararon entre sí mediante la prueba “t” de Student para 2 muestras, suponiendo que las varianzas son diferentes.

3.7 Efecto de Diferentes Combinaciones de Mg^{2+} , Mn^{2+} Y Co^{2+} Sobre la Resistencia de los Quistes a Diferentes Concentraciones de SDS

Esta parte del trabajo se dividió en dos etapas: en la primera etapa el medio PEHPS se usó directamente o se suplementó con 3 mM de (a) $MgCl_2$, (b) $MgCl_2$ y $MnCl_2$ o (c) $MgCl_2$, $MnCl_2$ y $CoCl_2$. En los quistes formados en cada uno de los medios mencionados se determinó el porcentaje de quistes resistentes a SDS al 0.4%. Los resultados obtenidos en el medio PEHPS sin adiciones se compararon contra los resultados obtenidos con los medios (a-c), mediante la prueba “t” de Student.

En la segunda etapa, el PEHPS se suplementó con concentraciones variables de $MgCl_2$, $MnCl_2$ y $CoCl_2$. Para el cálculo de estas concentraciones se utilizó el método de optimización autodirigida Simplex Secuencial Básico que permite determinar el efecto de varias variables interdependientes al mismo tiempo (Shavers CL, Parsons ML and Deming SN, 1979; Hendrix CD, Union Carbide Co., 1970). Por su importancia se describe a continuación:

3.7.1 Descripción del Método Simplex Secuencial Básico.

Es un método sistemático de optimización de tipo secuencial, aplicable a sistemas en que deben considerarse los efectos de múltiples factores interactuantes.

Los experimentos se inician con $K + 1$ pruebas (donde K = al número de factores a optimar), los resultados de estas pruebas se jerarquizan del mejor al peor y se “elimina” el ensayo del peor resultado. Se realiza un cálculo sencillo para obtener las condiciones del ensayo que reemplazará al “eliminado”. El procedimiento se repite secuencialmente manteniendo $K + 1$ pruebas.

Ecuación para calcular los valores de las variables en el siguiente grupo de ensayo:

$$\bar{X} = \frac{2 \times \text{DE LOS MEJORES GRUPOS} - \text{VALOR DEL PEOR GRUPO}}{2}$$

Esquemáticamente se tendrá, con 2 variables: un triángulo; con 3 variables: un tetraedro.

Con 3 variables. Se sugiere empezar como sigue:

GRUPO	X1	X2	X3	RESPUESTA
A	BAJO	BAJO	ALTO	
B	ALTO	BAJO	BAJO	
C	BAJO	ALTO	BAJO	
D	ALTO	ALTO	ALTO	

En este caso los ensayos se iniciaron con 4 pruebas (K = 3 factores: $[Mg^{2+}]$, $[Mn^{2+}]$ y $[Co^{2+}]$) siguiendo el siguiente patrón:

GRUPO	Mg (mM)	Mn (mM)	Co (mM)	% Resistencia
A	1	1	4	
B	4	1	1	
C	1	4	1	
D	4	4	4	

Se eliminó el “peor” ensayo, es decir, aquel en el cual se obtuvo el menor porcentaje de quistes resistentes a una concentración determinada de SDS (0.4%).

Con la ecuación antes enunciada se calcularon las siguientes concentraciones de cada catión para el ensayo siguiente. Este ciclo se repitió hasta que se observó que el porcentaje de quistes resistentes a SDS no era muy diferente que la del mejor grupo de la serie anterior.

3.8 Análisis de los Componentes de Paredes de Quistes por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

3.8.1 Determinación de los Tiempos de Retención de Estándares.

Se determinó el tiempo de retención de los siguientes monosacáridos (símbolo y concentración inyectada al cromatógrafo entre paréntesis): glucosa (GLU; 4.2 mg/ml), manosa (Man; 3.56 mg/ml), fucosa (Fuc; 3.7 mg/ml), N-acetilglucosamina (NAG; 45 µg/ml), ácido N-acetilmurámico (NAM; 60 µg/ml) y ácido N-acetilneuramínico (NAN; 48.3 µg/ml). Estos estándares se disolvieron en H₂SO₄ 5 mM y se filtraron (filtros de 0.45 µm, HVLP, Millipore). De cada solución se inyectaron por separado 20 µl en un cromatógrafo de líquidos System Gold (Beckman) equipado con una columna de exclusión iónica, Aminex HPX-87H (Bio-Rad), utilizando un sistema isocrático de elución con H₂SO₄ 5 mM, un flujo de 0.3 ml/min y detección a 193 nm en un detector de arreglo de diodos (System Gold 168, Beckman). Se registraron los tiempos de retención y la absorbancia a 193 nm. Después se hizo una mezcla con la masa indicada de cada uno de los estándares mencionados, se disolvieron en H₂SO₄ 5 mM, la mezcla se filtró y se inyectaron 20 µl para su análisis, de la misma manera que los estándares. Cada cromatograma se grabó en la memoria de la computadora del cromatógrafo y se imprimió para su análisis.

3.8.2 Curvas Estándar de NAG y Glucosa.

Para la cuantificación de los monosacáridos se realizaron curvas de calibración con diferentes concentraciones de los estándares NAG y glucosa; de NAG se prepararon soluciones de 3.62, 36.2 y 362 µg/ml y para glucosa: 0.048, 0.48 y 4.8 mg/ml, disueltas en la fase móvil (H₂SO₄ 5 mM), en base a la concentración inyectada y las alturas de los picos identificados por tiempo de retención se determinó la ecuación de regresión para NAG ($y = 0.0028X + 0.0323$) y para glucosa ($y = 0.0992X + 0.0039$), con el fin de

calcular la concentración de los compuestos identificados en cada una de las muestras analizadas.

3.8.3 Obtención de Paredes de Quistes y Glicocalix de Trofozoitos

(Arroyo-Begovich, 1980).

Se resuspendieron en 5 ml de agua desionizada 100 mg de una pastilla liofilizada de: quistes formados en PEHPS adicionado con $MgCl_2$ 1.22 mM, $MnCl_2$ 14.44 mM y $CoCl_2$ 19.44 mM (ME20), quistes espontáneos o de trofozoitos creciendo en fase exponencial en el medio PEHPS y quistes de *E. invadens* formados en condiciones axénicas en medio LG. Cada una de las suspensiones se sometió a 10 ciclos de sonicación (75 W por 30 s por ciclo) con intervalos de 30 s entre cada ciclo. Se utilizó un sonicador LAB-LINE® ULTRATIP, Labsonic System: LAB-LINE INSTRUMENTS, INC. Melrose Park, Illinois, USA. El material sonificado se transfirió a un tubo cónico, graduado, de 12 ml de capacidad (Bellco, Glass Inc. Vineland, NJ, USA) y se aforó a 10 ml con agua desionizada, se lavó 3 veces con agua desionizada. Para sedimentar el material en cada lavado se centrifugó a 700 x g por 15 min.

3.8.4 Obtención de Polisacáridos de Pared y Oligosacáridos del Glicocalix

(Arroyo-Begovich y col. 1980).

El material obtenido de las paredes de quistes o glicocalix de trofozoitos se resuspendió en 10 ml de HCl 0.5 N y cada muestra se incubó por 15 min a temperatura ambiente en tubos cónicos de vidrio con tapón de rosca y contratapa de teflón. Este material se lavó dos veces con agua desionizada (centrifugando a 700 x g por 15 min) y el precipitado se resuspendió en 1 ml de una mezcla de alcohol etílico absoluto/NaOH 1N (2:1; v/v) y se calentó por 5 min en un baño de agua en ebullición. Este material se filtró con filtros de microfibras de vidrio Whatman GF/A 2-4 cm (Whatman Ltd. Maidstone England) en Swinnex-25 (Millipore) y el material retenido se recuperó volteando el filtro con ayuda de unas pinzas limpias y eluyendo el material con 5 ml de agua desionizada,

este material se colocó en ampollitas de vidrio, taradas y prelavadas con cloroformo/metanol (v/v) y se liofilizó. Después se determinó el peso seco de los polisacáridos.

3.8.5 Hidrólisis Ácida de Quitina y NAG (Rupley, 1964).

Para estas determinaciones se usaron 5.0 mg de quitina de exoesqueleto de camarón (Sigma Chem Co. St. Louis Mo., USA) y 2.5 mg de N-acetil-D-glucosamina (NAG, 99% de pureza). Como la pureza de la quitina de camarón no fue informada por el fabricante, se obtuvo quitina purificada donada por el Dr. Everardo López Romero. La quitina se lavó y recristalizó siguiendo el método de Reynolds (cf. ref. Berger y Reynolds, 1958). Brevemente: 100 g de quitina comercial se incubaron durante 8 h con 500 ml de permanganato de potasio al 2% a temperatura de laboratorio y después se hicieron lavados sucesivos con ácido oxálico al 1%, HCl 2 *N*, agua desionizada, etanol y eter etílico; la muestra se secó a 50 °C, al vacío. Después del tratamiento anterior se consideró la pureza de la quitina de camarón como 100%.

La quitina y la NAG se incubaron (en atmósfera de nitrógeno) con 1 ml de HCl 11*N* durante 10, 20, 30 ó 40 h, calentando a 40 °C en una placa de calentamiento (Thermolyne, 17600). Las muestras se enfriaron a 4 °C al terminar la hidrólisis y después se llevaron a sequedad en un concentrador de sólidos (CENTRIVAP™ LABCONCO; Labconco Corporation, Kansas City, USA) (100 µm de Hg, 1800 rpm, 5 h).

El material seco se redisolvió en 1 ml de H₂SO₄ 5 mM. De cada una de estas preparaciones se tomaron 100 µl y el volumen se aforó a 1 ml con H₂SO₄ 5 mM. Estas muestras se analizaron mediante CLAR igual que como se hizo con los monosacáridos usados como estándares.

3.8.6 Hidrólisis de Polisacáridos de Pared y Oligosacáridos del Glicocálix.

Los polisacáridos u oligosacáridos liofilizados se resuspendieron en 1 ml de HCl 11 N. Se transfirieron a tubos eppendorf de 1.8 ml de capacidad. Después se procedió a la hidrólisis ácida y análisis por CLAR como se hizo con la quitina y los estándares. Pero para la hidrólisis, en vez de tiempos variables, las muestras se incubaron por un tiempo fijo de 10 h.

3.8.7 Identificación y Cuantificación de los Productos de Hidrólisis Ácida de los Polisacáridos de Pared de Quistes por CLAR.

Los productos del hidrolizado de las paredes y de las membranas plasmáticas de los trofozoítos se separaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, como se hizo con los estándares. Los compuestos se identificaron: comparando los tiempos de retención de los picos experimentales con cada uno de los picos de los estándares, y por coinyección con los estándares; para esto, la solución de muestra se mezcló con un volumen igual de una mezcla de estándares de NAG y GLU (36.2 µg/ml y 0.48 mg/ml, respectivamente) y se inyectó para su análisis. Una vez identificados estos compuestos (NAG y GLU) se determinó la concentración en las muestras inyectadas, utilizando las rectas de calibración determinadas para los estándares correspondientes.

3.9 Microscopía de luz

3.9.1 Afinidad de las Paredes de los Quistes por Calcoflúor White M2R.

Una gota de una suspensión de trofozoitos o de quistes se colocó sobre un portaobjetos y se añadió una gota de calcoflúor white M2R al 0.1%. Las células se observaron con un fotomicroscopio Axiophot (Zeiss, Germany) equipado con sistema de filtros de fluorescencia (Filtros de Triple Banda DAPI, FITC/TEXASRED). Las imágenes se registraron fotográficamente. Para esto se usó película Kodak Ektachrome ISO 400/27° (diapositivas a color) y película TMAX TMZ p3200 para fotografía en blanco y negro.

3.9.2 Afinidad por AGT-Fluoresceína.

De las muestras de trofozoitos, quistes espontáneos, quistes formados en medio suplementado con cationes y quistes de *E. invadens* previamente fijadas con glutaraldehído al 5% se colocaron 1×10^6 células en tubos eppendorf de 1.8 ml de volumen, se lavaron con solución amortiguadora de tris.HCl centrifugando a 4,000 rpm/30 s en microfuga (microfuga 11, Beckman). A cada una de las muestras se agregaron 500 μ l de la solución de AGT-fluoresceína, 0.5 mg/ml, se incubaron 30 min en la oscuridad a temperatura de laboratorio y se lavaron 2 veces con la solución de tris.HCl/NaCl. Las muestras se observaron en el fotomicroscopio y se registraron fotográficamente. Se usaron películas Kodak Ektachrome ISO 400/27° para fotografías a color y TMAX TMZ p3200, para fotografías en blanco y negro.

3.10 Efecto de Quitinasa, Celulasa y Lisozima Sobre los Quistes de *E. histolytica*

De los quistes de *E. histolytica* formados en medio suplementado con cationes, se colocaron 1.5×10^5 quistes en tubos eppendorf de 1.8 ml de volumen y se sometieron al efecto de quitinasa de *Streptomyces griseus* (8 unidades totales), celulasa de *Penicillium funiculosum* (320 unidades totales) y lisozima de huevo de gallina (1,264 unidades totales). Las muestras se incubaron a 37 °C, en un medio hipoosmótico (PBS, 50 mOsm/Kg). Después de 3 y 36 h de incubación se observó el efecto de las enzimas sobre la morfología de los quistes y la afinidad de éstos por el calcoflúor white M2R.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Estandarización de los Métodos de Cultivo

4.1.1. Crecimiento de *E. histolytica* en Medio Preparado con Lotes de EHP Cocido en Recipientes de Polietileno o de Aluminio.

Los cultivos crecidos en medio PEHPS preparado con EHP cocido en un recipiente de polietileno crecieron más rápido que los crecidos en un medio elaborado con PEHP cocido en un recipiente de aluminio. Además, los primeros llegaron a una densidad mayor que los segundos. A los cuatro días los cultivos mantenidos en medio elaborado con PEHP cocido en un recipiente de polietileno era dos veces mayor ($p < 0.01$) que los cultivos crecidos en un medio elaborado en presencia de aluminio (Fig 1). En ambas curvas de crecimiento se observa una fase lag de cero a 24 h, una fase de crecimiento exponencial de las 48 a las 96 h, y una fase estacionaria después de las 96 h.

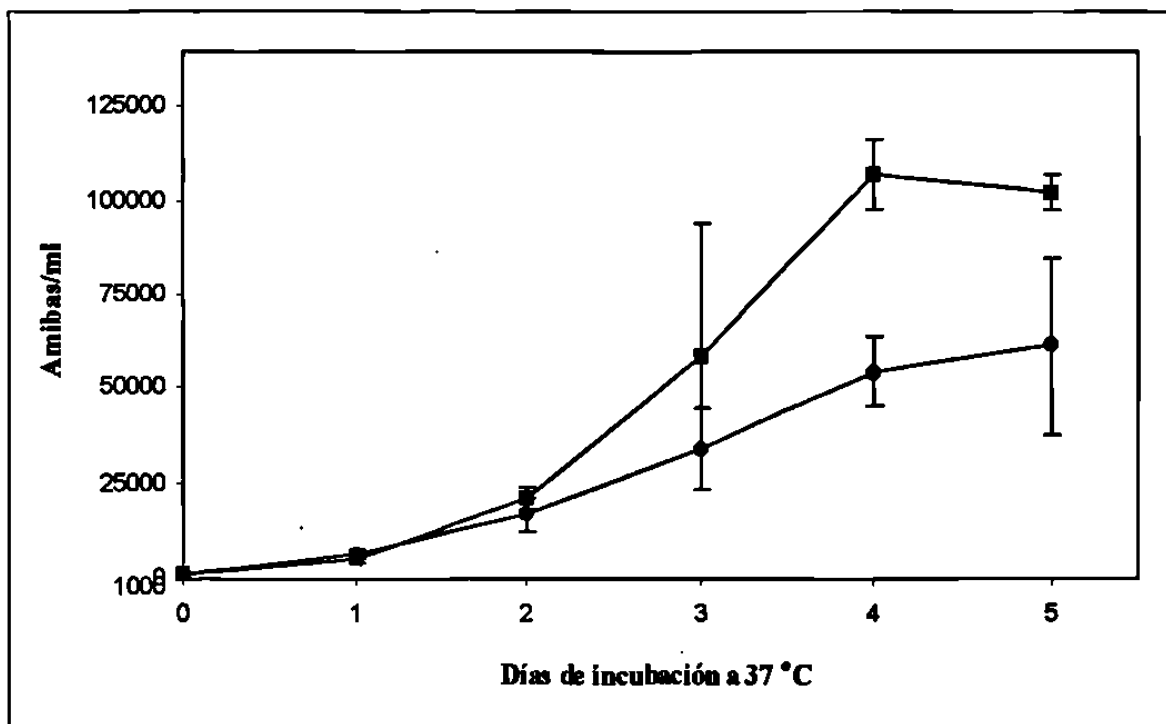


Fig 1. Crecimiento de trofozoítos de *E. histolytica*, cepa HM-1:IMSS en medio PEHPS, utilizando lotes de EHP preparados en recipientes de aluminio (●) o de polietileno (■). Promedio de tres experimentos \pm error estándar (DE/\sqrt{n}).

4.1.2 Resistencia a Choques Hipoosmóticos y a Detergentes de los Quistes de *E. histolytica* Formados en Medio PEHPS, Adicionado con 3 mM de $MgCl_2$, $MnCl_2$ y $CoCl_2$ y Preparado con EHP Cocido en Recipientes de Polietileno o de Aluminio

No se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) en el porcentaje de quistes resistentes a choques hipoosmolares formados en medio con EHP cocido en recipientes de polietileno (93.9%) o de aluminio (82.5%). Sin embargo la proporción de quistes formados en medio elaborado en recipientes de polietileno, resistentes al efecto del SDS al 0.05%, fue 3.12 veces mayor ($57.6\% \pm 23.6$) que los formados en recipientes de aluminio ($18.5\% \pm 11.6$), no se encontró diferencia significativa ($\alpha = 0.05$). Por otro lado, el 10.3% de los quistes formados en medio elaborado en recipientes de polietileno resistió el efecto del SDS al 0.1% mientras que sólo el 1.9% de los quistes formados en el medio elaborado en presencia de aluminio resistió el efecto de SDS al 0.1% (Fig 2).

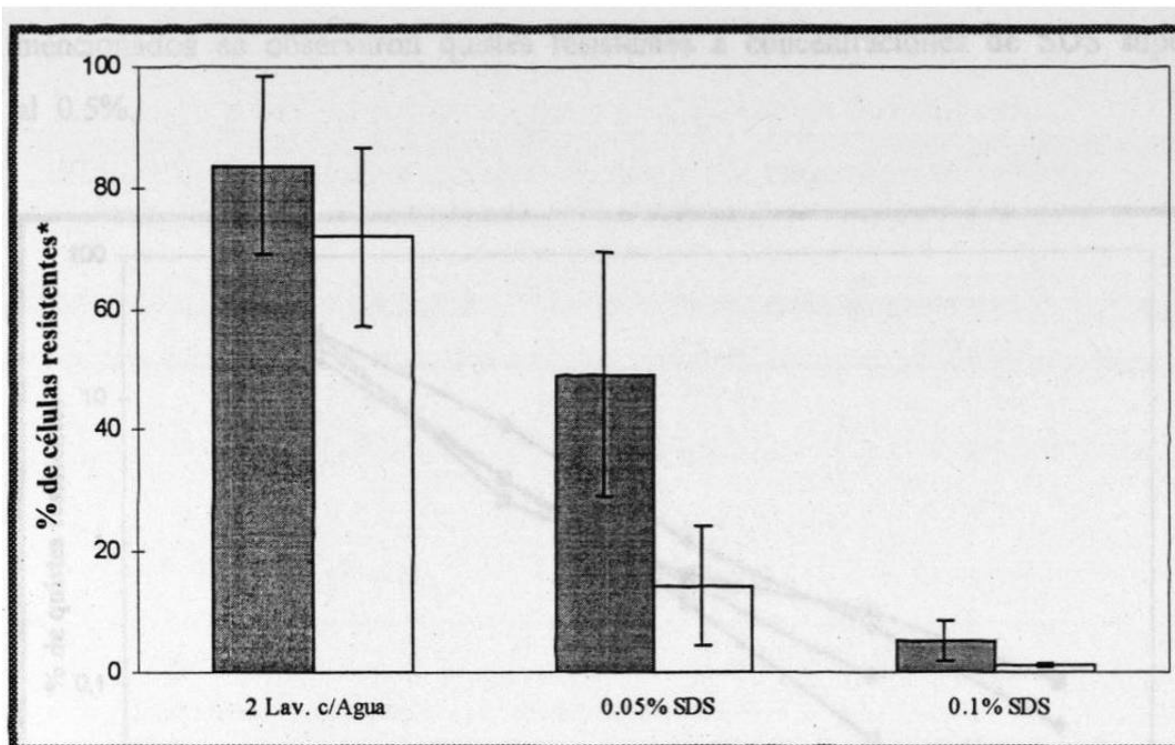


Fig 2. Resistencia a choques hipoosmóticos y concentraciones variables de SDS de quistes de *E. histolytica* formados en medio PEHPS más 3 mM de $MgCl_2$, $MnCl_2$ y $CoCl_2$. Medio preparado con EHP cocido en un recipiente de aluminio (□) o de polietileno (■). 100% = 5.6×10^6 amibas en diferentes estadios de diferenciación inmediatamente antes de someterlos a choques hipoosmóticos con agua bidestilada o al efecto de SDS a diferentes concentraciones. Promedio \pm desviación estándar de tres experimentos.

4.2 Requerimiento de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} 3 mM Para la Formación de Quistes de *E. histolytica* Resistentes a SDS

La figura 3 muestra que el porcentaje de quistes de *E. histolytica* resistentes a SDS, formados en medio suplementado con Mg^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} ó Mg^{2+} y Mn^{2+} y Co^{2+} se incrementó con respecto al porcentaje de quistes formados en medio no adicionado con cationes. En todos los casos se observó una relación de la resistencia inversamente proporcional a la concentración de SDS. Por otro lado el mayor porcentaje de quistes resistentes a 0.4% de SDS correspondió a los quistes formados en medio suplementado con los 3 cationes. Con Mg^{2+} y Mn^{2+} ó Mg^{2+} y Mn^{2+} y Co^{2+} se observó una pequeña proporción de quistes resistentes a 0.5% de SDS y con ninguno de los tratamientos

mencionados se observaron quistes resistentes a concentraciones de SDS superiores al 0.5%.

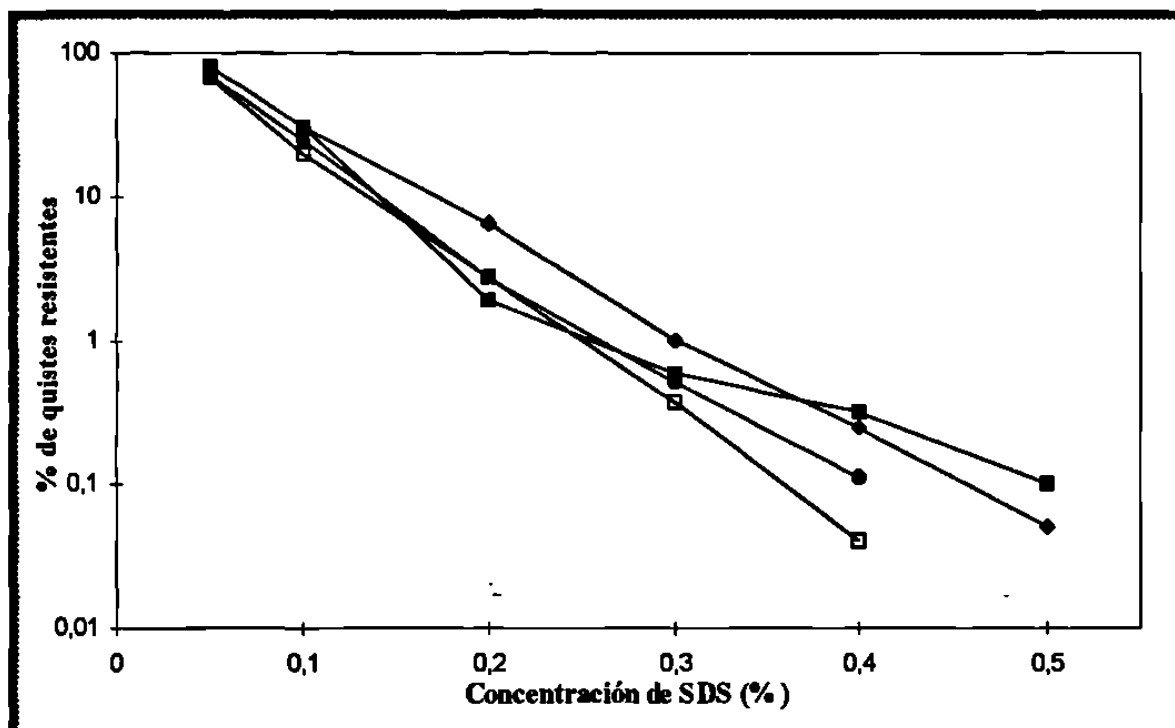


Fig 3. Contribución de Mg²⁺ (●), Mg²⁺ y Mn²⁺ (◆) y Mg²⁺, Mn²⁺ y Co²⁺ (■) sobre la resistencia a concentraciones variables de SDS, de quistes formados en medio PEHPS. 100% de resistencia equivale a 12×10^6 quistes. (□) Testigo en PEHPS sin cationes adicionados. Cationes adicionados en concentración 3 mM de cada uno. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos.

La tabla 1 muestra que el porcentaje de quistes resistentes a 0.4% de SDS fue 8 veces mayor cuando éstos se formaron en el medio suplementado con los tres cationes que cuando se formaron en el medio no suplementado ($p < 0.01$). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de quistes formados en medio adicionados con sólo uno o dos cationes con respecto al porcentaje de resistencia de los quistes formados en el medio no adicionado.

TABLA 1.

Resistencia a SDS al 0.4% de quistes de *E.histolytica* formados en medio PEHPS suplementado con diferentes combinaciones de cationes.

Cationes agregados al medio ^a	Porcentaje de resistencia ^b	
	Absoluta	Relativa
Ninguno	0,04 ± 0,02	1,0
Mg ²⁺	0,11 ± 0,11	2,5
Mg ²⁺ y Mn ²⁺	0,25 ± 0,15	6,3
Mg ²⁺ , Mn ²⁺ y Co ²⁺	0,32 ± 0,06	8,0 *

^a Cada uno de ellos tenía una concentración 3 mM.

^b Con respecto a la población total, antes del tratamiento con SDS al 0.4%: $12 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6$.

^c Con respecto a la población de quistes formados en medio sin cationes adicionados.

* Grupo que presentó diferencia significativa ($p < 0.01$).

Promedio de 4 experimentos ± desviación estándar.

4.3 Efecto de Diferentes Combinaciones de Mg²⁺ y Mn²⁺ y Co²⁺ Sobre el Porcentaje de Quistes Resistentes a SDS

Aplicando el método Simplex Secuencial Básico se diseñaron y probaron sistemáticamente 20 combinaciones de Mg²⁺ y Mn²⁺ y Co²⁺ (Fig 4A).

Al comparar las figuras 4A y 4B se observa que a medida que aumentó la concentración de las cationes Mn²⁺ y Co²⁺ se incrementó la proporción de quistes resistentes a SDS. Además, las poblaciones de quistes adquirieron resistencia a concentraciones progresivamente mayores de SDS a medida que se progresó en la aplicación del método Simplex Secuencial Básico, hasta hacerse manifiesta la resistencia a SDS al 1% en el grupo 10 (Mg²⁺ 4 mM, Mn²⁺ 10 mM y Co²⁺ 10 mM).

Este aumento en el porcentaje de quistes resistentes coincidió con el incremento sistemático de la concentración de Mn²⁺ y Co²⁺ en el medio de enquistamiento y con una disminución discreta en la concentración de Mg²⁺ (Fig 4A y 4B).

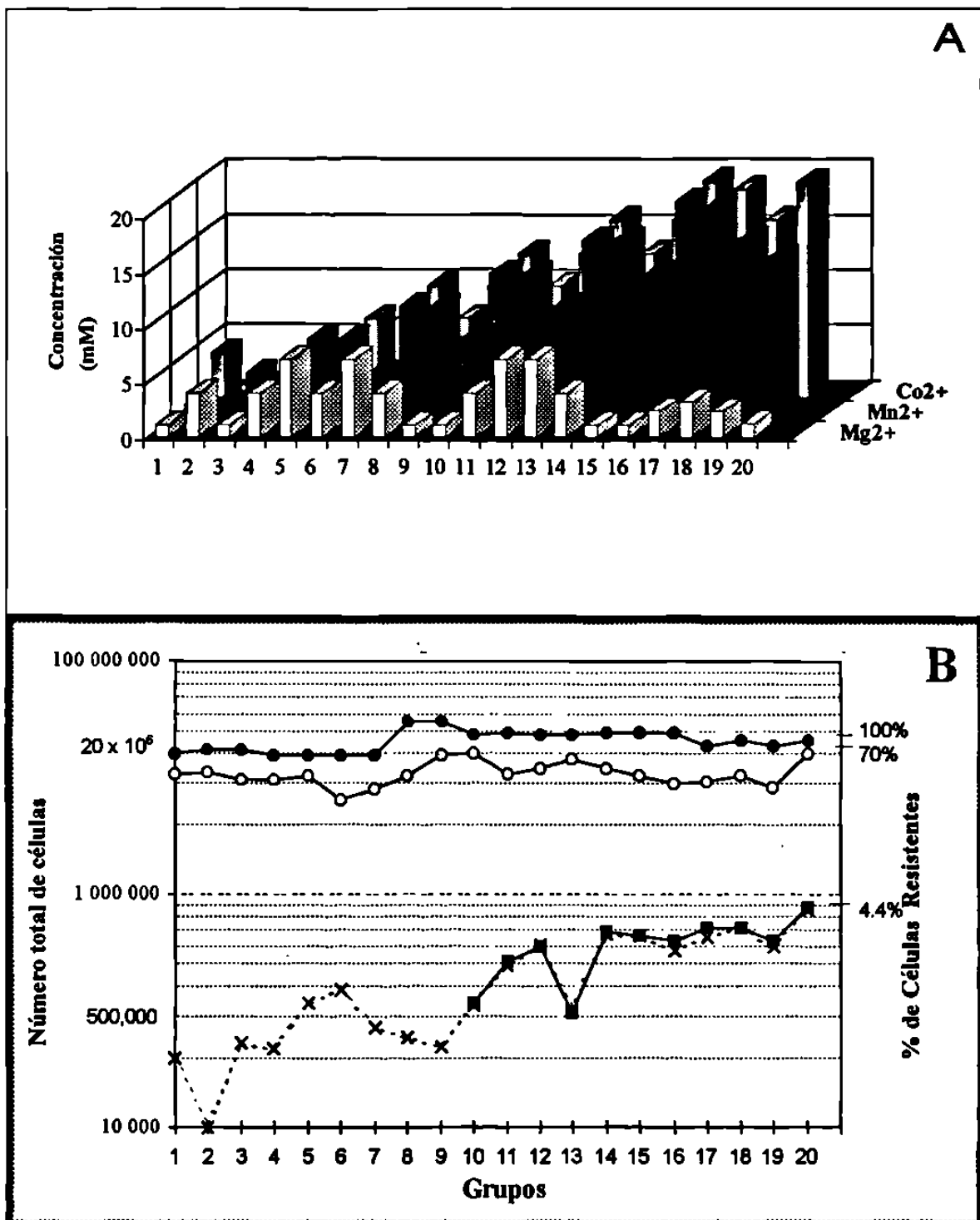


Fig 4. Efecto de diferentes combinaciones de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} sobre la resistencia de quistes a diversos tratamientos. (A) Combinaciones de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} determinadas de acuerdo con los resultados obtenidos secuencialmente aplicando el método Simplex Secuencial Básico. (B) Resistencia de quistes al efecto de agua bidestilada (O), SDS al 0.4% (x) o al 1% (■). Porcentajes calculados con respecto a la población total, inmediatamente antes de su transferencia al medio con diferentes combinaciones de cationes (●).

La combinación de Mg^{2+} 1.22 mM, Mn^{2+} 14.44 mM y Co^{2+} 19.44 mM adicionada al PEHPS (ME 20) produjo la mayor proporción de quistes resistentes a la más alta concentración de SDS probada (1%): el 70% del total de células cosechadas fueron quistes resistentes a dos lavados con agua bidestilada (Fig 4B). De éstos, el 4.4% eran quistes resistentes al 0.4% de SDS (14 veces mayor que el porcentaje de resistencia mostrada por los quistes formados en medio adicionado con una concentración 3 mM de cada uno de los cationes analizados).

TABLA 2.

Eficiencia de enquistamiento de *E.histolytica* en medio PEHPS suplementado con $MgCl_2$ (1.22mM), $MnCl_2$ (14.44 mM) y $CoCl_2$ (19.44 mM) (Grupo 20)^a

Población inicial ^b		Quistes formados ^c		Quistes resistentes a 1% de SDS	
Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa ^d	Absoluta	Relativa ^e
$1,6 \times 10^7$	1,00	$1,08 \times 10^7$	$0,67 \pm 0,14$	$3,9 \times 10^5$	$3,61 \pm 1,43$

^a Calculado por medio del método Simplex Secuencial Básico.

^b Trofozoítos en fase de crecimiento exponencial en medio PEHPS

^c Resistentes a dos lavados con agua desionizada

^d Con respecto a la población inicial, antes de cambiarlos a medio de enquistamiento.

^e Con respecto a la población de quistes formados.

Promedio de 3 experimentos \pm desviación estándar.

En la tabla 2 se observa que el 67.5% de los trofozoítos se enquistaron y de éstos, el 3.61% resistieron el efecto del SDS al 1%; es decir, el 2.44% con respecto a la población inicial de trofozoítos antes de su incubación en medio suplementado con cationes.

4.4 Análisis de los Polisacáridos de Pared de Quistes Formados en Medio de Enquistamiento Adicionado con ME20

4.4.1 Análisis de los Estándares por CLAR.

Los tiempos de retención (expresados en min) de los estándares fueron los siguientes: N-acetilglucosamina: 22.4; glucosa: 17.4; galactosa: 18.4; fucosa: 21.3; manosa: 18.3; ácido N-acetilmurámico: 19.7; ácido N-acetilneuramínico: 15.6 min; (Fig 5). La glucosamina se detectó al tiempo muerto: 11.7 min (cromatograma no mostrado).

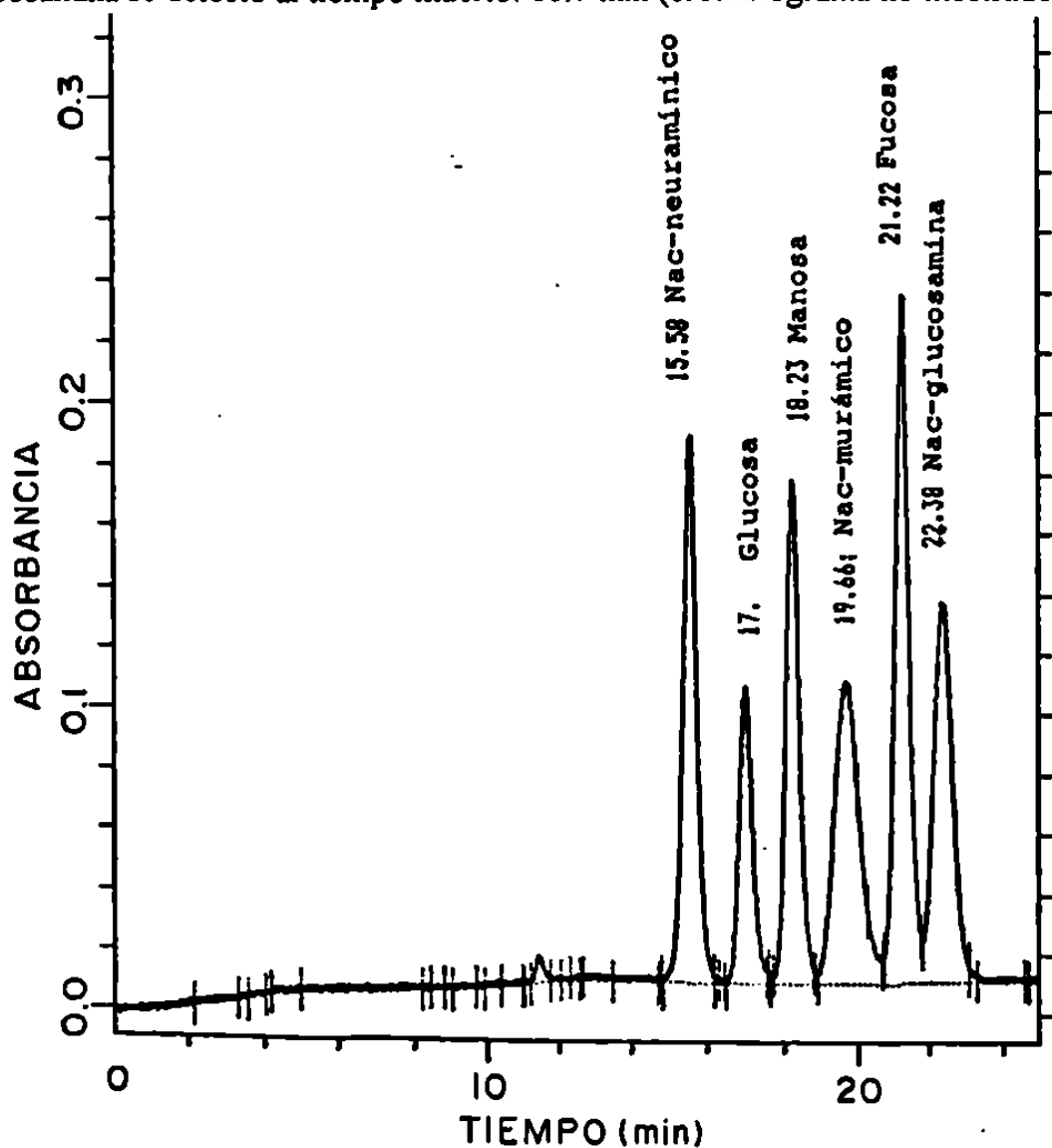


Fig 5. Separación de estándares, posibles componentes de polisacáridos de pared, por CLAR de exclusión iónica (Aminex HPX-87H) y detección a 193 nm.

4.4.2 Recuperación de NAG y NAG Proveniente de Quitina Hidrolizada.

La cantidad de NAG recuperada después de hidrolizar el estándar de NAG o quitina fue inversamente proporcional con respecto al tiempo de hidrólisis con HCl 11 N a 40 °C. El mayor porcentaje de recuperación del estándar de NAG (90% con respecto a la cantidad inicial) y de NAG proveniente de quitina (62%) se observó a las 10 h (Fig 6).

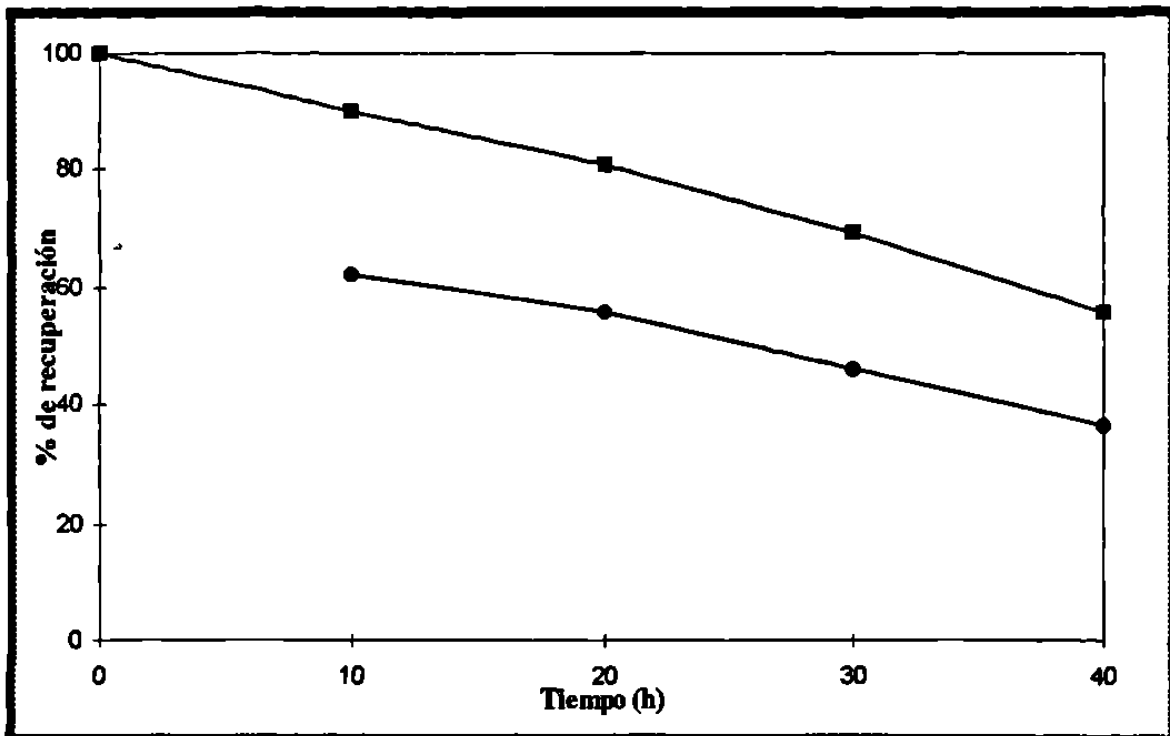


Fig 6. Porcentaje de recuperación de NAG en función del tiempo de hidrólisis con HCl 11N, a 40 °C, a partir de 2.5 mg (100%) de un estándar de NAG (■) y de 5.0 mg (100%) de quitina de exoesqueleto de camarón (●).

4.4.3 Identificación y Cuantificación por CLAR de los Productos de Hidrólisis Ácida de los Polisacáridos de Paredes de Quistes.

En cada una de las muestras analizadas se identificaron tres picos (Fig 7). Uno de ellos correspondió al tiempo muerto de la columna. Los otros dos se identificaron como GLU y NAG, respectivamente, a juzgar por la coincidencia de sus tiempos de retención con los estándares respectivos (17.4 y 22.4 min) y por la sobreposición en los picos de estos mismos estándares con los picos de la solución experimental cuando ambas preparaciones se coinyectaron en el cromatógrafo (Fig 8).

No se observaron diferencias al comparar el contenido de GLU y NAG en las muestras de trofozoítos (Fig 7A) con el contenido de las hexosas correspondientes en quistes formados en medio sin cationes adicionados (Fig 7B). En cambio, la cantidad de GLU y NAG detectada en los quistes formados en el ME20 (Fig 7C) se incrementó 2.4 y 120 veces, respectivamente con respecto al contenido de GLU y NAG en los trofozoítos y en los quistes formados en PEHPS (Tabla 3). Los quistes de *E. invadens* (Fig 7D) contenían una cantidad de GLU 1.68 y 2.04 veces menor y de NAG 1.66 y 1.78 veces mayor que la encontrada en trofozoítos o quistes de *E. histolytica* formados en PEHPS, respectivamente.

Por otro lado el contenido de GLU y de NAG en los quistes formados en medio suplementado con cationes fue 2.0 y 128 veces mayor que el encontrado en quistes formados en PEHPS y 2.4 y 119.4 veces mayor que el detectado en trofozoítos, respectivamente (Tabla 3).

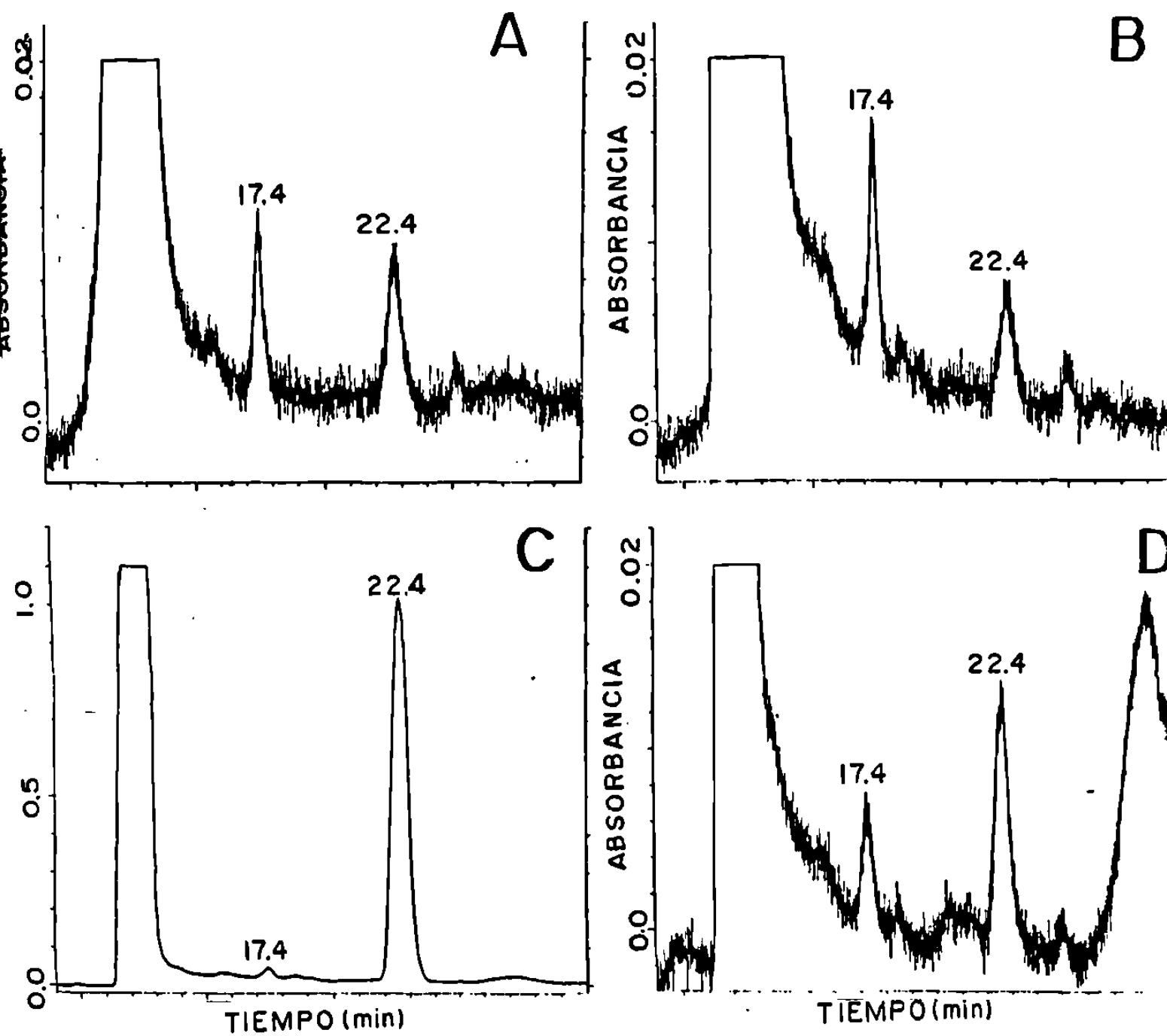


Fig 7. Cromatogramas de los productos de hidrólisis ácida de material sedimentable a 700 x g de: A) Trofozoítos, B) Quistes formados en PEHPS a los 14 días de incubación a 37 °C; C) Quistes de *E. histolytica* formados en ME2O; D) Quistes de *E. invadens* formados en medio LG. Nótese la escala de absorbancia en la fig C y compárese con las figs. A, B y D. El material sedimentable a 700 x g fue además resistente a lavados sucesivos con agua, HCl, NaOH y alcohol etílico.

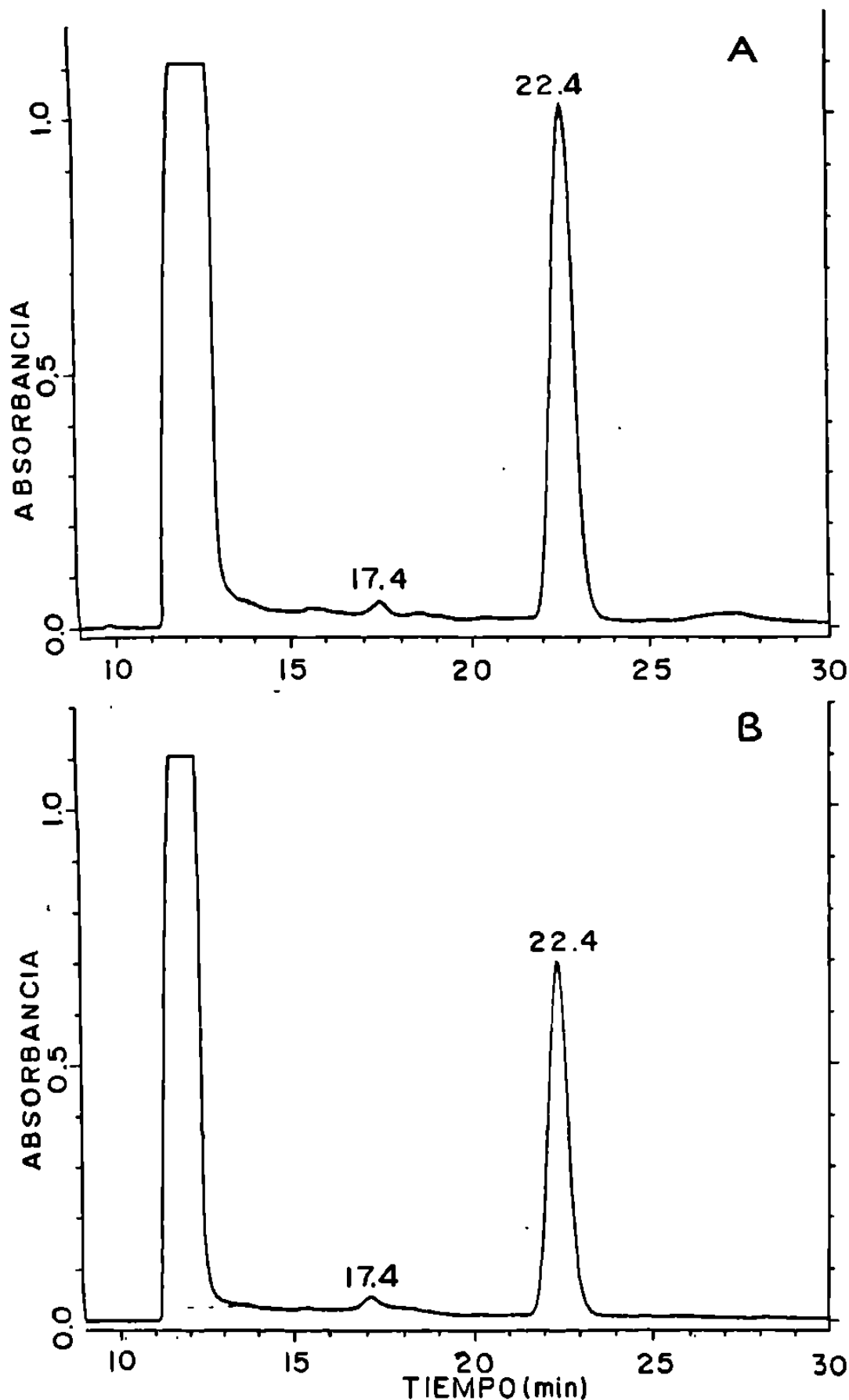


Fig 8. Identificación de GLU y NAG en productos de hidrólisis de polisacáridos de paredes de quistes de *E. histolytica* formados en ME20 (Fig 8A) por coinyección con estándares (8B). Nótese la presencia de dos picos bien definidos (GLU y NAG) después del análisis de la muestra mezclada (v/v) con la solución de estándares, como se explicó en métodos.

TABLA 3.

Contenido de N-Acetilglucosamina y glucosa en diferentes estadios de diferenciación de *E. histolytica* y en quistes de *E. invadens*^a

Especie	N-acetilglucosamina		glucosa	
	Absoluta (μg)	Relativa	Absoluta (μg)	Relativa
Trofozoítos	1.3	1.0	139.6	1.0
Quistes formados espontáneamente ^b	1.2	0.9	169.6	1.2
Quistes formados en M.E. ^c	156.5	119.4	338.9	2.4
Quistes de <i>E. invadens</i> ^d	2.2	1.7	83.0	0.6

^a Partiendo de 100 mg de peso seco de cada una de las muestras.

^b En PEHPS normal, después de 14 días de incubación a 37 °C.

^c Medio de enquistamiento = PEHPS adicionado con MgCl_2 (1.22 mM), MnCl_2 (14.44 mM) y CoCl_2 (19.44 mM).

^d Formados en medio bajo en glucosa (LG).

4.5 Destrucción de Quistes Incubados en un Medio Hipotónico, en Presencia de Quitinasa

Los quistes formados en ME20 perdieron su afinidad por el calcoflúor después de 3 h de incubación con quitinasa (Fig 9). El 72% de ellos se lisaron después de 36 h de incubación en las condiciones mencionadas; en cambio, la incubación de los quistes en presencia de celulasa o lisozima no mostró diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) con respecto a los testigos incubados en medio hipotónico sin enzimas, aún después de 36 h de incubación (Fig 10); además, las paredes de los quistes incubados en presencia de celulasa y lisozima mantuvieron su afinidad por el calcofluor (Fig 11).

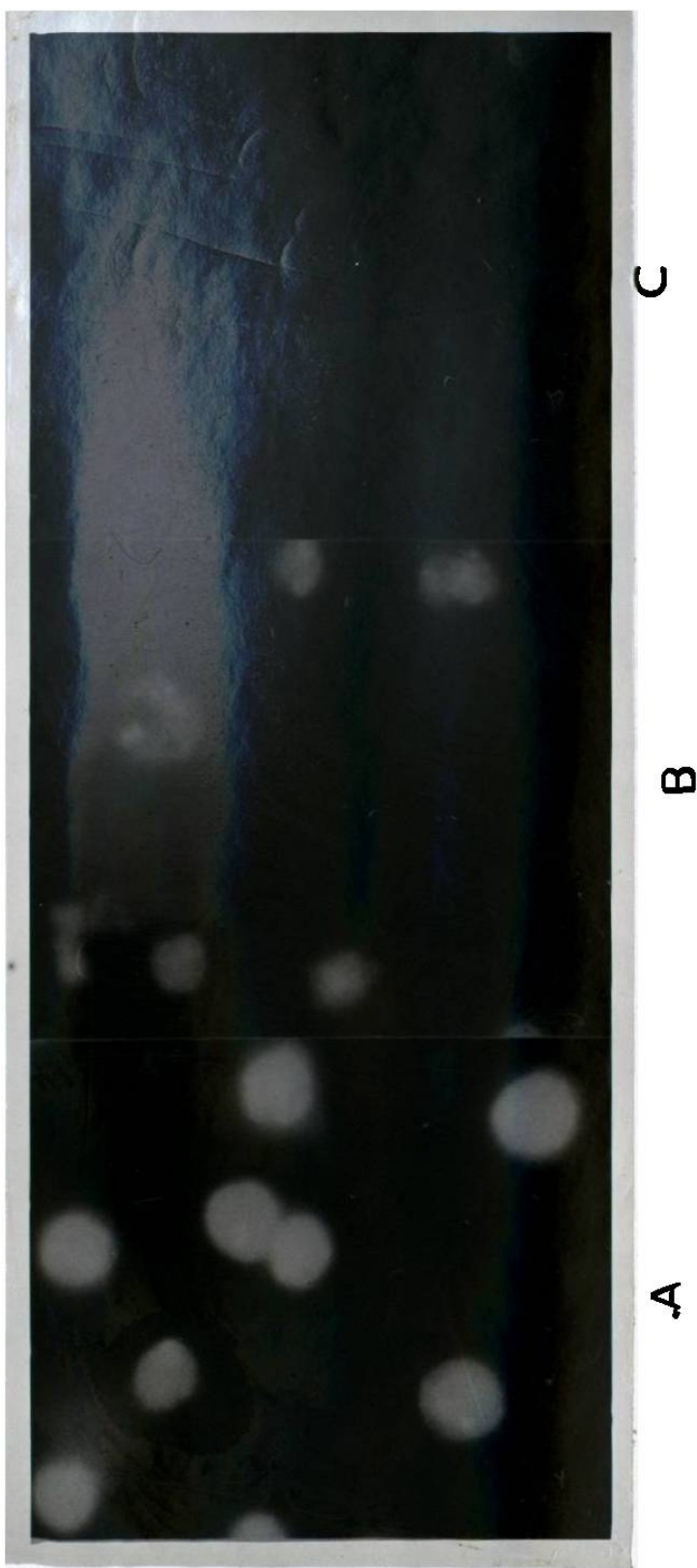


Fig 9. Efecto de quitinasa sobre la afinidad de los quistes de *E. histolytica* formados en ME20 por el calcoflúor white M2R.
A) Quistes incubados con PBS; B) Quistes después de 3 h de incubación con quitinasa; C) Quistes después de 36 h de incubación con la enzima.

Nótese el efecto sobre la estructura de los quistes (B) y la pérdida de éstos por el calcoflúor (C).

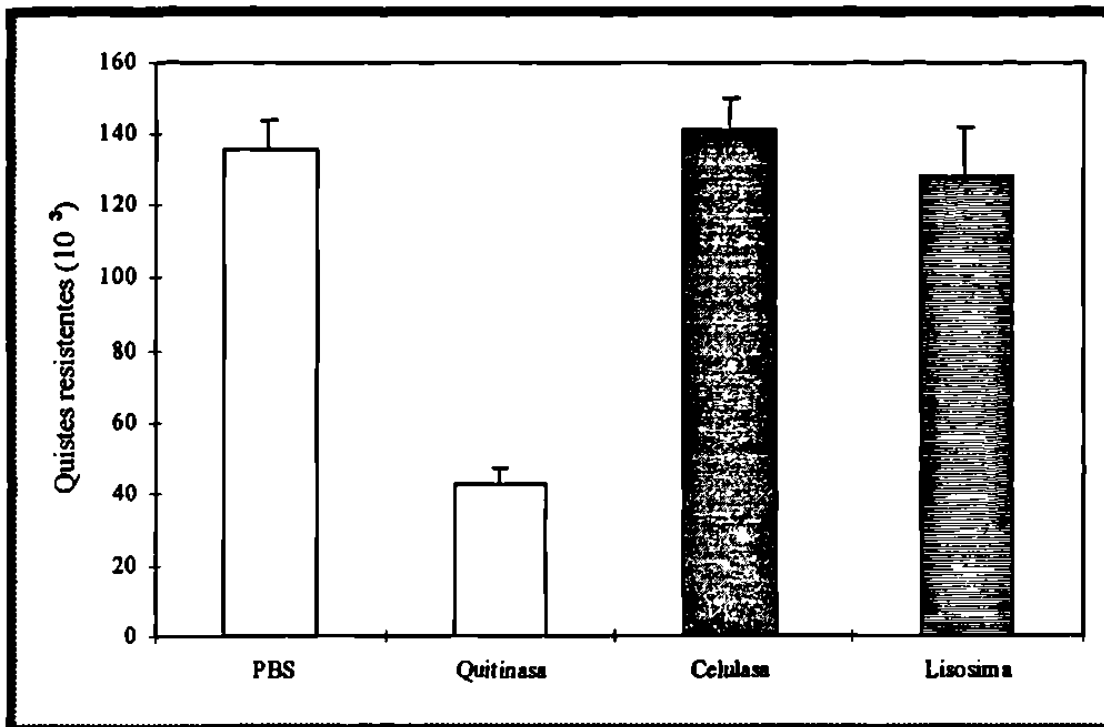


Fig 10. Destrucción de quistes por efecto de quitinasa de *Streptomyces griseus* (8 unidades totales). Notese que la celulasa de *Penicillium funiculosum* (320 unidades totales) y la lisozima de huevo de gallina (1,264 unidades totales) no tuvieron efecto significativo ($\alpha = 0.05$) sobre los quistes, en condiciones comparables de ensayo, (incubación durante 36 h a 37 °C).



Fig 11. Efecto de quitinasa, celulasa y lisozima sobre los quistes de *E. histolytica* formados en ME20. Las muestras se incubaron 3 h con las enzimas en un medio hopotónico (50 mOsm/Kg). Nótese el efecto de la quitinasa (A) sobre la pérdida de afinidad por el calcofluor y sobre la morfología de los quistes. Cuando se incubaron con celulasa (B) o lisozima (C) en las mismas condiciones, los quistes conservaron su afinidad por el calcofluor.

4.6 Afinidad de los Quistes por Calcofluor y por Aglutinina de Germen de Trigo Marcada con Fluoresceína

El 100% de los quistes formados en ME20 o PEHPS mostraron una fuerte afinidad por la aglutinina de germen de trigo, observándose una fluorescencia uniforme e intensa en color amarillo limón. Los trofozoítos también mostraron afinidad por la lectina, pero ésta fue heterogénea (Fig 12). Algunos trofozoítos fluorecieron en tonos desde amarillo hasta amarillo limón y la mayor parte en rojo; algunos más mostraron la mayor parte de su superficie en color rojo con pequeñas manchas en amarillo o viceversa (Fig 13).

Las paredes aisladas de quistes de *E. histolytica* formados en ME20 y las paredes de quistes de *E. invaden* sometidas a sonicación, mostraron una fuerte afinidad por el calcofluor (Fig 14). Las paredes observadas con contraste de fases parecían como sacos rígidos, vacíos.

Los trofozoítos y los quistes formados en PEHPS no resistieron el efecto de la sonicación. Sin embargo, en estos últimos se observaron numerosas partículas con afinidad por el calcofluor.

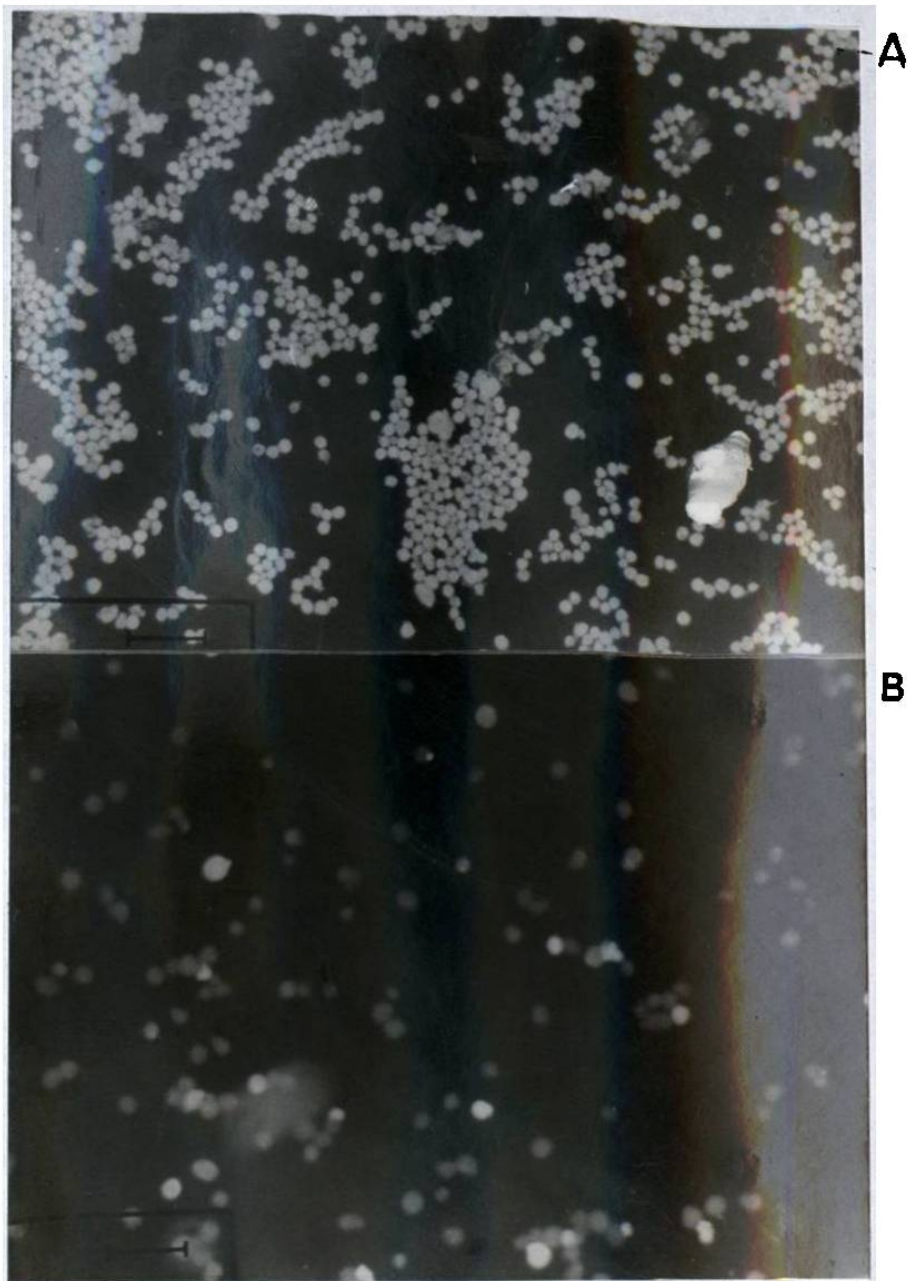


Fig 12. Afinidad de diferentes estadios de diferenciación de *E. histolytica* por la aglutinina de germen de trigo marcada con fluoresceína. (A) Quistes formados en ME20; (B) Trofozoitos creciendo en fase exponencial en medio PEHPS. Las muestras se incubaron y observaron en las mismas condiciones (ver métodos); los tiempos de exposición son equivalentes. Nótese que algunos trofozoitos presentan afinidad por la lectina.

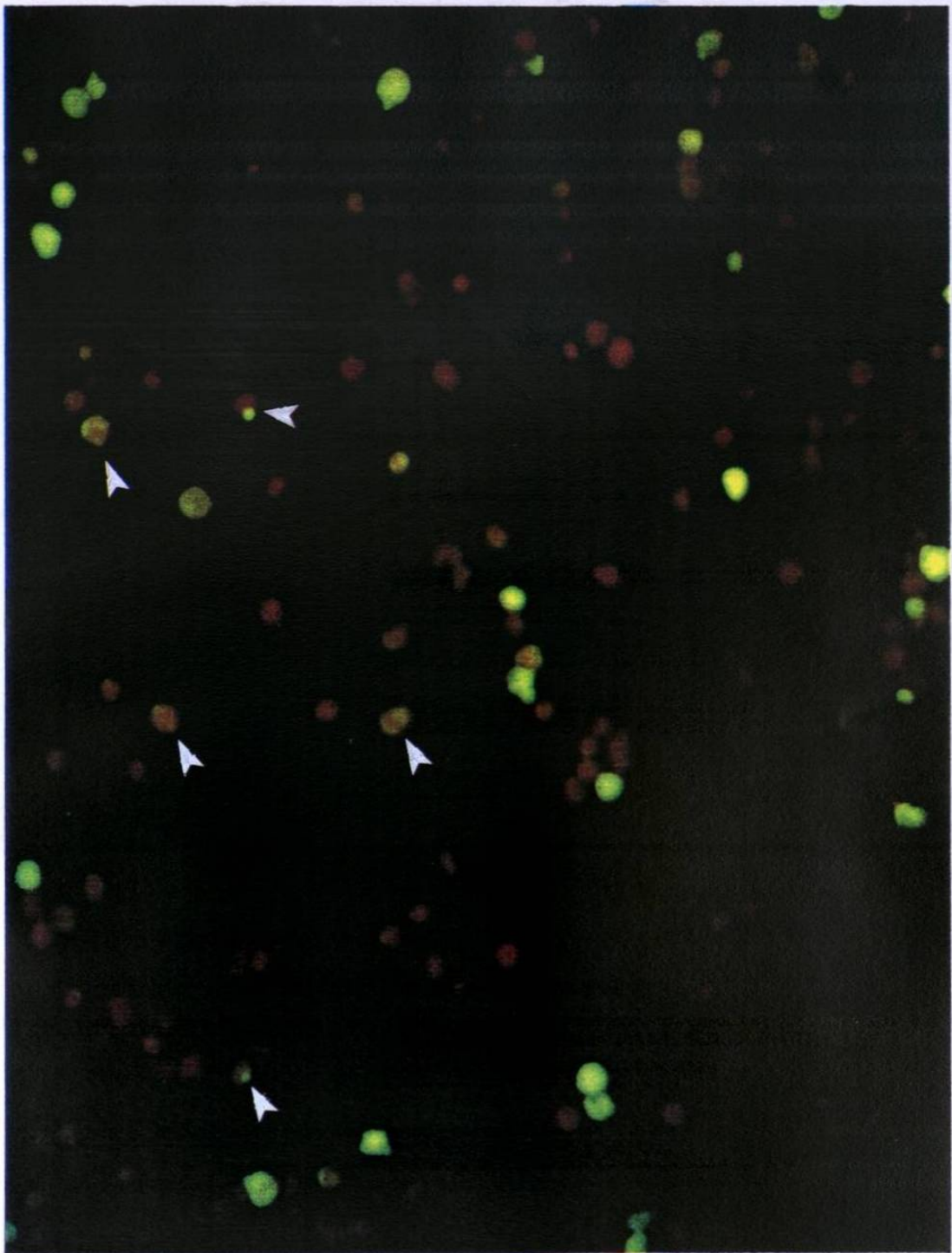


Fig 13. Trofozoitosde *E. histolytica* creciendo en fase exponencial teñidos con aglutinina de germen de trigo marcada con fluoresceína. Nótese la presencia de ambas fluoresciendo en rojo, amarillo limón o con ambos colores (cabezas de flecha blancas).

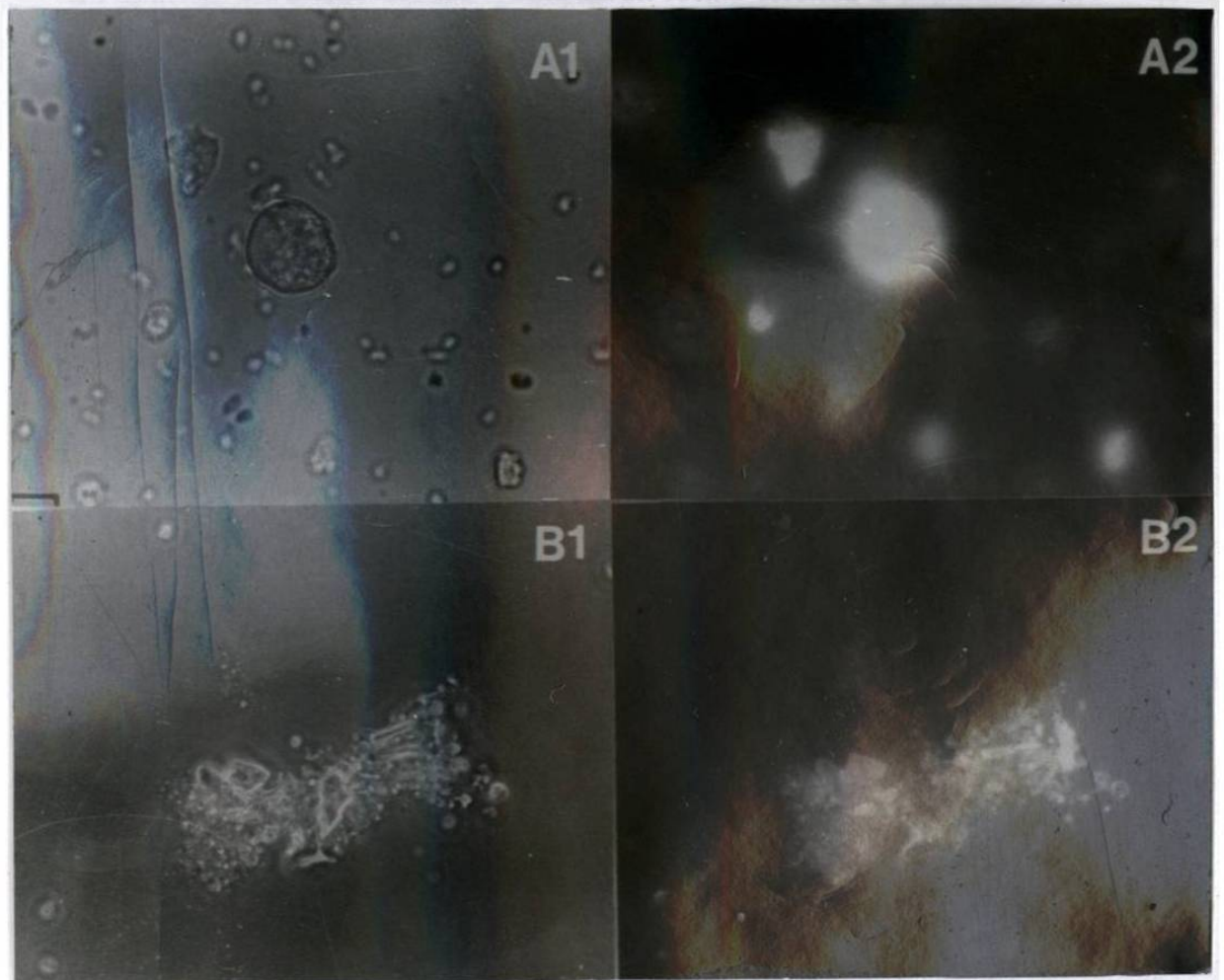


Fig 14. Paredes de quistes resistentes a 10 ciclos de sonicación, y su afinidad por el calcoflúor white M2R. **A)** Quistes de *E. histolytica* formados en PEHPS suplementado con cationes (ME20). A1= Contraste de fases; A2 = Fluorescencia.
B) Quistes de *E. invadens* formados en medio LG. B1= Contraste de fases; B2= fluorescencia

4.7 Aspecto de un Quiste Típico Formado en ME20

En general, los quistes viables presentaron forma esférica u oval; muestran una clara birrefringencia, de uno a cuatro núcleos, citoplasma de aspecto granulado con vacuolas y vesículas pequeñas y escasas en número (fig 15).

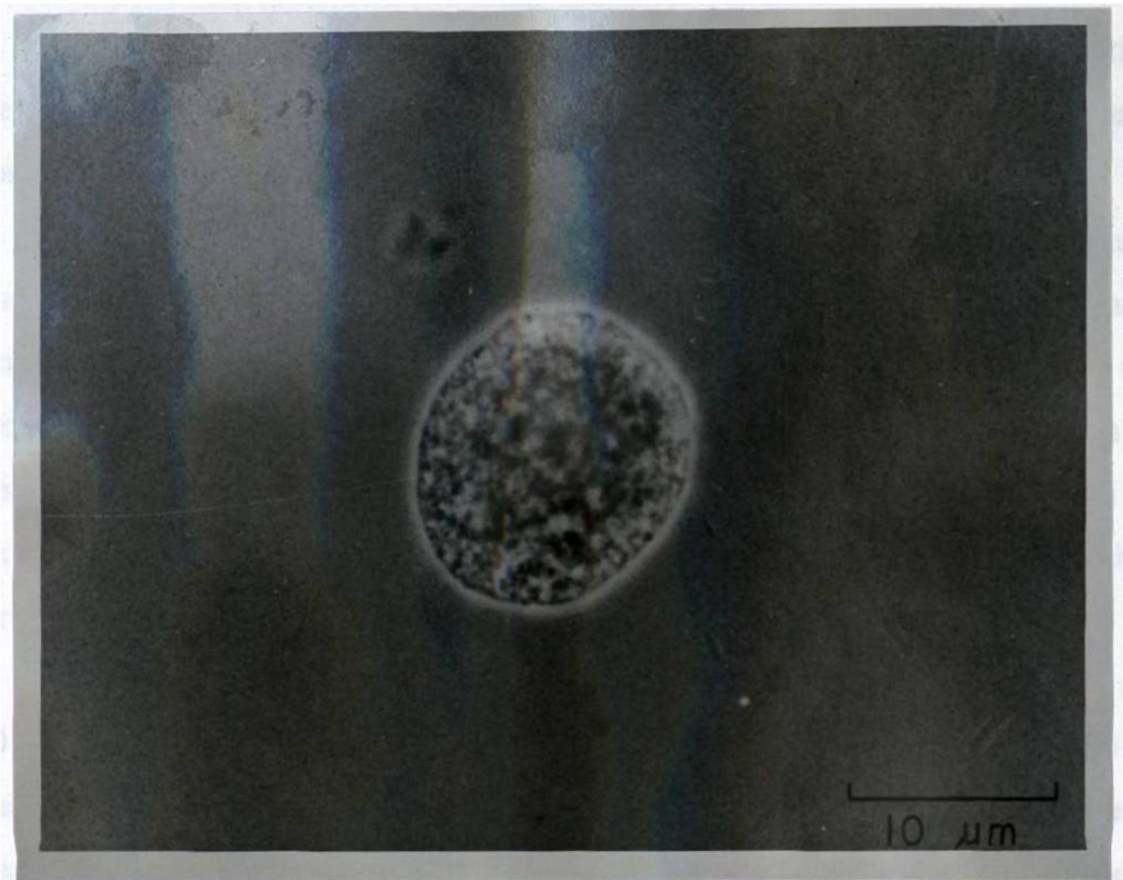


Fig 15. Aspecto de un quiste típico de *E. histolytica* formado en ME20, observado con contraste de fases; su diámetro aproximado es de 14 μm .

CAPITULO 5

DISCUSION

5.1 Discusión

Entamoeba histolytica es capaz de formar quistes espontáneamente en cultivos envejecidos, crecidos en PEHPS (Said-Fernández y col., 1988), lo cual no ocurre en otros medios para cultivo axénico de estos protozoarios (Martínez-Palomo A, 1982).

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

De acuerdo con esto, se propuso que los quistes formados en condiciones axénicas no adquieren la resistencia característica de los quistes naturales, posiblemente porque el medio PEHPS carece de los nutrientes necesarios para una síntesis más adecuada de la pared en cuestión; porque contiene inhibidores de la síntesis de algún componente importante para la resistencia de la pared; porque las cepas de amibas usadas en dicho trabajo habían perdido la información genética necesaria para completar la síntesis de la pared en una forma adecuada; o por una combinación de dos o de las tres posibilidades (Said-Fernández y col., 1988). Este trabajo se desarrolló en el contexto de la primera posibilidad, bajo la pregunta: ¿qué nutriente o nutrientes podría(n) requerirse para favorecer la síntesis de una pared más resistente?. Para tratar de contestarla se hicieron las siguientes consideraciones: las paredes de hongos y de otros protozoarios tienen una

matriz de polisacáridos. Esta matriz es la principal responsable de su resistencia (Ruíz-Herrera y Xoconostle-Cázares, 1995) y generalmente está constituida por quitina o celulosa (Neff RJ y Benton WF, 1962).

La pared de *E. invadens*, un protozoo de reptiles filogenéticamente muy cercano a *E. histolytica*, tiene quitina como componente mayoritario (Arroyo-Begovich y col., 1980). Los quistes de *E. histolytica* también contienen quitina (Arroyo-Begovich y col., 1980). Las quitina sintasas, enzimas responsables de la síntesis de este polisacárido, han sido descritas en varias especies de hongos y en *E. invadens*; estas enzimas dependen de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} en diferentes combinaciones (Choi W. y Cabib E., 1994; Orlean P., 1987; Causier BE y col., 1994; Das S y Gillin FD, 1991). Entonces, *E. histolytica* tiene quitina sintasas dependientes de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} y la combinación adecuada de estos cationes en el medio de enquistamiento debería resultar en un incremento de la síntesis de quitina y por lo tanto en una mayor resistencia a choques hipotónicos y detergentes.

En apoyo a esta idea se observó que el medio PEHPS contiene una proporción más alta de extracto de páncreas que otros medios para el cultivo axénico. Como el páncreas es muy rico en Mg^{2+} (CIBA Geigy, Tablas Científicas; 1971), posiblemente uno de los componentes del PEHPS que favorece el enquistamiento de *E. histolytica* en condiciones axénicas es el Mg^{2+} ; pero por otro lado, quizás la concentración de este catión no es suficientemente alta como para sustentar la síntesis total de la matriz de los quistes de *E. histolytica* y/o el PEHPS carecía de Mn^{2+} y/o Co^{2+} .

El análisis por espectrofotometría de absorción atómica reveló que el medio PEHPS contiene cantidades mayores de Mg^{2+} y Mn^{2+} (3.38 y 1.6, respectivamente) que el medio TYI-S-33, mientras que la cantidad de Co^{2+} es menor en PEHPS (0.72 veces) que en TYI-S-33. Estos resultados sugirieron fuertemente que se podría estar sobre una de las pistas correctas, y que si se encontraba la combinación adecuada de Mg^{2+} , Mn^{2+} y/o Co^{2+} se favorecería la síntesis de quitina y consecuentemente se incrementaría la resistencia de las paredes formadas en condiciones axénicas.

La estrategia para poner a prueba esta hipótesis consistió en analizar el incremento de la resistencia de las paredes en función de los cambios que se hicieran a la composición del medio; y cuando se tuviera el mayor incremento posible en el porcentaje de quistes resistentes, investigar si dicho cambio era coincidente con un incremento en la presencia de quitina y con la cantidad de este polímero sintetizada por los quistes formados en el medio modificado con respecto a los quistes formados en PEHPS.

La prueba de resistencia consistió en incubar los quistes con diferentes concentraciones de SDS, de 0.1 a 1%. Este criterio se usó porque es bien sabido que la matriz polisacáridica de las paredes, pero no otros elementos de pared o de membrana plasmática, son capaces de mantenerse intactos en presencia de detergentes iónicos como el SDS.

El trabajo experimental se inició con la estandarización de los métodos de cultivo. Estos consistieron en analizar sistemáticamente la densidad de los cultivos de amibas y el porcentaje de quistes formados en medios elaborados con lotes de hígado y páncreas adquirido en diferentes expendios. Estos órganos se probaron lavados exhaustivamente o sin lavar (datos no mostrados). Lo anterior se hizo con el fin de investigar si los contaminantes o el manejo de los órganos (por ejemplo tiempo y temperatura de almacenamiento podrían influir sobre el enquistamiento); como no se encontraron diferencias entre los resultados correspondientes, se descartó esta posibilidad.

Otra posible fuente de variación en los resultados era el modo de elaboración del EHP: por razones prácticas, en el laboratorio se modificó el método de cocción del EHP, y en lugar de calentar en autoclave el homogenado de hígado y páncreas en un recipiente hecho con un material inerte, como el polietileno, se hizo en un recipiente de aluminio. Dicha modificación favorece la disolución en el medio de cantidades no controlables de este catión, que podrían interferir con el efecto del Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} cuyo efecto se deseaba evaluar. Los resultados indicaron que la elaboración del EHP en presencia de

aluminio resultaba en una menor densidad de los cultivos y un porcentaje menor de quistes resistentes al agua y a bajas concentraciones de SDS que los observados en cultivos crecidos en medio elaborado con los mismos lotes de hígado y páncreas, pero cocidos en ausencia de aluminio. Para evitar desviaciones importantes en los resultados por las causas discutidas se decidió adquirir el páncreas y el hígado en un solo establecimiento y elaborar un lote de EHP en la forma clásica (Said-Fernández y col., 1988) y en cantidad suficientemente para todo el proyecto. Se usó también un lote único de suero bovino.

El análisis del efecto de diferentes combinaciones de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} consistió en determinar la importancia de cada uno de estos cationes en la formación de quistes resistentes a choques hipotónicos en agua y concentraciones variables de SDS.

El primer paso consistió en analizar el efecto de un solo catión, dos o tres, a concentración 3 mM de cada uno de ellos. La combinación de los tres cationes produjo el mayor porcentaje de quistes resistentes a SDS con respecto a los quistes formados en PEHPS sin adiciones. Sin embargo la proporción de quistes resistentes era aún muy baja (0.32%) y la máxima concentración de SDS que éstos soportaban era de 0.4%.

El siguiente paso consistió en determinar la concentración de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} que favorecía la mayor proporción de quistes resistentes. Se consideró que el análisis sistemático del efecto de cada catión hubiera requerido demasiado tiempo. Por otro lado, en varios microorganismos dos o más quitina sintetas funcionan coordinadamente para conformar la pared (Cabib E. y col. 1993; Bulawa CE y Osmond CB, 1990; Silverman SJ y col., 1988) y éstas suelen depender de combinaciones diferentes de los cationes mencionados, por ejemplo en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (Orlean P., 1987). Por esto, si este fuese el caso de *E. histolytica*, el análisis de uno por uno de los cationes no solo sería complicado, sino probablemente inexacto o inútil. Era necesario entonces analizar el efecto de las tres variables al mismo tiempo. Por esta razón se recurrió al método Simplex Secuencial Básico. Este método es ampliamente usado en la industria

para optimizar la producción de biomasa o de productos específicos, como enzimas u hormonas (Shavers CL y col. 1979). Este método es empírico; es decir para progresar en la optimación de la producción de un producto biológico se requiere hacer varios experimentos donde se modifiquen sistemáticamente los valores numéricos de cada variable, de acuerdo con un diseño matemático preestablecido y con los resultados obtenidos en el experimento inmediato anterior (Hendrix CD, Union Carbide Co., 1970; Shavers CL y col. 1979). De esta manera se diseñó la composición de 20 medios, cuatro por vez, cuyas únicas variables eran la concentración de cada uno de los tres cationes analizados. Para este estudio se partió de cuatro medios formulados de acuerdo con las instrucciones del método Simplex Secuencial Básico, y el estudio se terminó cuando se dejaron de observar progresos en los resultados. Se observó que el incremento en la concentración de Mn^{2+} y Co^{2+} coincidió con un incremento sistemático en el porcentaje de quistes resistentes al 0.4%. A partir de la décima formulación (medio ME10), que contenía 4 mM de $MgCl_2$, 10 mM de $MnCl_2$ y 10 mM de $CoCl_2$, se observó un cambio drástico en la resistencia de los quistes a SDS. Los quistes formados en estas condiciones ahora eran resistentes a 1% de SDS, lo cual constituyó una mejora en las cualidades de la pared extraordinariamente importante, porque eso significaba que los quistes formados en un medio que contenía la combinación adecuada de los tres cationes en estudio tenían una resistencia comparable a la de los quistes naturales (datos no publicados). Es interesante que el mayor porcentaje de quistes resistente a 1% de SDS se observó en un medio con una concentración relativamente baja de Mg^{2+} (1.22 mM). Posiblemente este catión, a concentraciones más altas, inhibe alguna o algunas quitina sintasas ambientales. Es notable también que las concentraciones de Mn^{2+} y Co^{2+} que produjeron el mayor porcentaje de quistes resistentes a 1% de SDS (medio ME20) eran altas (14.44 y 19.44 mM, respectivamente) para considerarse fisiológicas. Por otro lado, los medios ME10 al ME20 precipitaron parcialmente; por lo tanto las amibas iniciaron y completaron su enquistamiento en un medio bifásico. Aparentemente se requieren ambas fases de dichos medios porque cuando analizamos por separado la fase sólida y la líquida del ME20, los quistes formados en sendas fases no resistieron el efecto del SDS al 1%, (datos no presentados). Se decidió continuar este estudio utilizando el ME20 porque nuestro

objetivo era investigar si la combinación adecuada de estos tres cationes estimulaba la síntesis de quitina durante el enquistamiento de *E. histolytica* y el ME20 produjo el rendimiento más alto de quistes resistentes a 1% de SDS. De esta manera se facilitaría el análisis cuantitativo por CLAR de los polisacáridos sintetizados en estas condiciones, aunque se corriese el riesgo de que los quistes obtenidos en tales condiciones estuviesen formando una pared con una matriz hipertrofiada.

El análisis por CLAR de los polisacáridos purificados de paredes de quistes formados en el ME20 permitió detectar una concentración de NAG 128, 120 y 72 veces mayor que los trofozoítos, que los quistes formados en PEHPS y que los quistes de *E. invadens*, respectivamente. Estos resultados junto con el incremento en resistencia de los quistes formados en el ME20 sugieren fuertemente que la combinación de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} contenida en este medio estimuló la síntesis de quitina en la pared de los quistes así formados. La afinidad por calcoflúor y aglutinina de germen de trigo y la destrucción de los quistes en medio hipotónico por quitinasa, pero no por celulasa o lisozima apoyan esta conclusión.

La información recabada hasta este momento no descarta la posibilidad de que la combinación de cationes contenida en el ME20 haya hiperestimulado alguna o algunas de las quitina sintasas de *E. histolytica* o que se haya inhibido la actividad de quitinasa: durante la morfogénesis de pared en *Saccharomyces cerevisiae* las quitinasas trabajan en una sutil armonía con las quitina sintasas (Cabib E y col., 1993); de tal manera que si se inhiben las quitinasas, las paredes se forman anormalmente. La mayor parte de los quistes formados en el ME20, observados por contraste de fases eran muy similares a los naturales (ver Said-Fernández y col. 1993), excepto porque no se observaron cuerpos cromatoides. Pero cabe aclarar que la ausencia de cuerpos cromatoides es debida a causas independientes a la presencia de Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} , regulada por mecanismos independientes de cationes divalentes (Morales-Vallarta M., 1991).

El análisis por CLAR reveló la presencia de GLU en los polisacáridos de los quistes formados en ME20, su concentración fue 2.4, 2 y 4 veces mayor que la de los trofozoitos, quistes formados en PEHPS y quistes de *E. invadens*, respectivamente. Por otro lado, el contenido de GLU en los polisacáridos de los quistes formados en medio PEHPS (ME20) fue 2.2 veces mayor que el de NAG. Esto significa que los quistes formados en condiciones axénicas tienen, además de quitina, otro polisacárido mayoritario. Es muy poco probable que dicho polisacárido sea glucógeno, porque este polímero se disuelve en agua (Stecher PG, 1968) y el proceso de purificación de polisacáridos incluyó lavar las paredes tres veces después de sonicar los quistes para romperlos; y durante la purificación de los polisacáridos el material se lavó dos veces con agua, después de una incubación con HCl. Otra posible fuente de la glucosa detectada es la desaminación y desacetilación de NAG proveniente de la quitina, pero bajo las condiciones de hidrólisis utilizadas en este estudio solo se degradó el 10% de la NAG pura usada como testigo, y la cantidad de glucosa detectada en las paredes de los quistes, no corresponde al 10%, sino que fue 2.17 veces mayor que el contenido de NAG. Por otro lado, tampoco es probable que el polisacárido putativo sea celulosa, porque los quistes no se destruyeron con celulasa, ni con la combinación de quitinasa y celulasa. La quitina podría estar formando una malla con el otro polisacárido o este otro polisacárido podría ser la matriz de una segunda pared. La presencia de dos paredes no es inusual en la naturaleza: los quistes de *Acanthamoeba castellanii*, por ejemplo, tienen dos paredes. Sin embargo, si esto fuera así, es claro que la supuesta matriz del polímero rico en GLU no resiste los choques hipotónicos ni el efecto de los detergentes, en vista de que los quistes tratados con quitinasa se lisaron en medio hipotónico.

Con respecto al tiempo muerto de los cromatogramas analizados, se observó un pico de gran tamaño, tanto en la muestra de quistes como de trofozoitos. Esto sugiere la presencia de un material abundante que no pudo ser analizado bajo las condiciones cromatográficas usadas en este trabajo. Durante el proceso de estandarización del método CLAR se observó que la glucosamina aparece al tiempo muerto y que el HCl usado para la hidrólisis tiene contaminantes que también aparecen al tiempo muerto.

Entonces podrían haberse excluido muchas otras moléculas desconocidas durante la cromatografía del hidrolizado de polisacáridos de pared. De tal manera que, con los datos recabados hasta ahora, no es posible determinar si la glucosa detectada y algunos otros carbohidratos son componentes de algún heteropolisacárido o uno o más oligosacáridos. Estos últimos podrían ser componentes tanto de la pared como del glicocálix de las amibas enquistadas o de los trofozoítos. Para determinar estas cuestiones será necesario analizar la morfología de los polisacáridos de los quistes y del material recuperado de los trofozoítos, e identificar los componentes que eluyen al tiempo muerto de la columna empleada, utilizando una columna resolutive para glucosamina o mediante cromatografía en placa fina.

En cuanto a los trofozoítos, es interesante hacer notar varios hallazgos inesperados: el primero de éstos consiste en que se recuperó una cantidad considerable de material utilizando la misma técnica descrita para purificar polisacáridos. Esta cantidad sin embargo fue 2.26 veces menor que la de los quistes formados en medio ME20. Es aceptado en forma generalizada que los trofozoítos no tienen pared y que solo la pared contiene polisacáridos. Por lo que la explicación más probable para estos hallazgos sería que lo que se recuperó fueron oligosacáridos del glicocálix, como ya se apuntó antes; sin embargo, en el análisis por CLAR se identificó un pico de NAG. Por otro lado, se observaron dos poblaciones claramente diferentes de trofozoítos después de incubar las amibas con aglutinina de germen de trigo marcada con fluoresceína: unas células que fluorescían en varios tonos e intensidades de amarillo limón, menos brillantes que los quistes, trofozoítos que fluorescían en color rojo intenso, y otras células con partes que fluorescían en amarillo y partes en rojo. Por otro lado, tanto las muestras de quistes como las de trofozoítos que se sometieron a sonicación mostraron algunas paredes vacías, con fuerte afinidad por la lectina, pero además numerosas vesículas intensamente fluorescentes (datos no presentados). Todo lo anterior sugiere que los trofozoítos y los quistes tienen organelos intracelulares que podrían ser los centros de síntesis de quitina, como sucede en hongos (Ruiz-Herrera y Xoconostle-Cázares, 1995). Pero además estos hallazgos sugieren muy fuertemente que la síntesis de quitina, y por lo tanto de pared, se

inicia desde etapas muy tempranas de los cultivos amibianos, en la fase de trofozoito. Esta observación ya había sido hecha en *E. invadens* (Morales-Vallarta M. y col., 1995). El color rojo de la mayoría de los trofozoitos de las muestras que se observaron indica que el glicocálix de las amibas tiene secuencias de NAG (Goldstein IJ y Poretz RD; 1986). Pero además, el color rojo de las amibas solo puede explicarse como un fenómeno de metacromacia de la fluoresceína, posiblemente debido a un cambio de pH en el microambiente de la membrana o por la interacción de moléculas muy cercanas a las secuencias de oligosacáridos a los que se unió la lectina o a que la preparación de aglutinina marcada con fluoresceína tenía fluoresceína libre y ésta, al unirse a la superficie de las amibas fluoresció en rojo. Es muy interesante que por serendipia se haya encontrado un método cualitativo para distinguir instantáneamente trofozoitos que han iniciado la síntesis de su pared de los que no lo han hecho y que se puedan identificar los posibles centros de síntesis, porque de esta manera se podrá aislarlos y analizar con detalle su composición y funcionamiento.

El porcentaje de quistes resistentes a agua fue del 70% en varios de los medios probados, pero el número de quistes resistentes a 1% de SDS es cuatro veces menor que el que usualmente producen los cultivos de *E. invadens*; este rendimiento relativamente bajo puede deberse a lo siguiente: siendo la cepa HM1:IMSS una población policlonal, es posible que un pequeño grupo de amibas sea capaz de formar una pared completa y la mayoría de estas amibas no. Una hipótesis alterna podría ser que algunas amibas son más capaces de enquistarse que otras y posiblemente mejorando las condiciones fisico-químicas y bioquímicas del medio de enquistamiento se incrementen los porcentajes de formación de quistes resistentes a 1% de SDS.

5.2 Conclusiones

- 1.- Durante el enquistamiento de *E. histolytica* en condiciones axénicas en medio PEHPS, una o varias quitina sintasas dependientes de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} , sintetizan quitina de alto peso molecular y/o alto grado de cristalización.
- 2.- En el medio PEHPS se inicia la síntesis de quitina desde la fase de trofozoíto.
- 3.- Además de quitina las paredes de los quistes contienen otro polisacárido mayoritario compuesto principalmente por glucosa.
- 4.- El medio ME20 constituye un avance importante para el conocimiento del enquistamiento de *E. histolytica* porque permitirá analizar con detalle la pared formada y la estructura de sus componentes.

5.3 Perspectivas

Con este trabajo se ha mejorado la calidad biológica de los quistes de *E. histolytica* formados en condiciones axénicas. Sin embargo, es necesario analizar con detalle su ultraestructura y sus principales propiedades fisiológicas; principalmente su capacidad para desenquistarse y de infectar animales susceptibles. Estos quistes no poseen cuerpos cromatoides y posiblemente tienen una matriz hipertrofiada y debido a ello todavía no sean biológicamente aptos para completar el ciclo biológico del parásito. Ahora sabemos que el Mg^{2+} , el Mn^{2+} y el Co^{2+} , son indispensables para la formación de su pared, pero falta encontrar la combinación de estos cationes que produzca quistes estructural y fisiológicamente normales e investigar si para lograr este objetivo se requieren otros nutrientes en el medio de enquistamiento, o éste contiene factores que inhiben el proceso de enquistamiento.

5.4 Contribuciones del Presente Trabajo

En el presente trabajo se ha mostrado que la quitina es un componente de pared esencial para conferir a los quistes de *E. histolytica* la resistencia necesaria para sobrevivir en condiciones adversas como hipoosmolaridad y presencia de detergentes. Ambas condiciones son muy comunes en su habitat natural (aguas residuales). La quitina y las enzimas responsables de su síntesis son ahora un importante blanco para desarrollar vacunas o medicamentos, porque al impedir la síntesis de quitina se interrumpirá también el ciclo biológico del agente causal de la amibiasis. La posibilidad para abordar este tema de investigación es una realidad a partir de los hallazgos aquí presentados.

REFERENCIAS

- Arroyo-Begovich, A., 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 marcada con partículas de oro coloidal. Arch.Invest.Méd.(Méx.) 11(supl.1):25-30. (1980).
- Arroyo-Begovich, A., Carabez-Trejo, A. y Ruíz-Herrera, J. Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. J.Parasitol. 66: 735-741. (1980).
- Berger, L.R.y Reynolds, D.M. The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. Biochem.Biophys.Acta. 29:522-534. (1958).
- Bulawa, C.E. y Osmond, B.C. Chitin synthase I and chitin synthase II are not required for chitin synthesis *in vivo* in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 87:7424-7428. (1990).
- Bulawa, C.E., Slater, M., Cabib, E., Au-Young, J., Sburlati, A., Adair, W.L. y Robins, P.W. The *Saccharomyces cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis *in vivo*. Cell. 46:213-225. (1986).
- Cabib, E., Sburlati, A., Bowers, B., y Silverman, S.J. Chitin synthase I, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J.Cell Biol. 108:1665-1672. (1989).
- Cabib, E., Mol, P.C., Shaw, J.A. y Choi, W. Biosynthesis of cell wall and septum during yeast growth. Arch.Med.Res. 24(3):301-303. (1993).
- Causier, B.E., Milling, R.J., Foster, S.G. y Adams, D.J. Characterization of chitin synthase from *Botrytis cinerea*. Microbiology. 140:2199-2205. (1994).

- Choi, W. y Cabib, E. The use of divalent cations and pH for the determination of specific yeast chitin synthetases. *Anal.Biochem.* 219:368-372. (1994).
- Das, S. y Gillin, F.D. Chitin synthase in encysting of *Entamoeba invadens*. *Biochem J.* 280:641-647. (1991).
- Diamond, L.S. Techniques of axenic cultivation of *E. histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae. *J.Parasitol.* 54:1074-1056. (1968).
- Diamond, L.S., Harlow, D.R. y Cunnick, C.C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. *Trans.R.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*. CRC Press Inc. USA. (1990). cap.2: pp.11-17.
- Diamond, L.S. Amebiasis: A Problem Solved. What Now? *Arch.Med.Res.* 23(4):157-161. (1992).
- Diamond, L.S. y Clark, C.G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) Separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J.Euk. Microbiol.* 40(3):340-344. (1993).
- Diem, K. Composición química del cuerpo humano y de sus órganos. En Tablas científicas, 6ª ed. Ciba Geigy, Basilea, Suiza. p.530. (1971).
- Dubinsky, P., Rybos, M. y Turcekova, L. Properties and localization of Chitin Synthase in *Ascaris suum* eggs. *Parasitol.* 92:219-225. (1986).

- Erlandesen, S.L., Bemrick, W.J. y Pawley, J. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia lamblia* duodenalis. *J.Parasitol.* 75:787-797. (1989).
- Farkas, V. Biosynthesis of cell walls of fungi. *Microbiol.Rev.* 43(suppl.2):117-144. (1979).
- Glaser, L. y Brown, D.H. The synthesis of chitin in cell free extracts of *Neurospora crassa*. *J.Biol. Chem.* 228:729-742. (1957).
- Gutierrez, G. Investigaciones Mexicanas sobre Vacunas. Amibiasis. Boletín Mensual de Epidemiología. 2(11):125-133. (1987).
- Hendrix, C.D. Empirical Optimization in Research and Development. Reporte interno para Union Carbide Corporation, South Charleston, West Virginia, U.S.A. (1970).
- Horst, M.N. The biosynthesis of crustacean chitin by a microsomal enzyme from larval brine shrimp. *J.Biol.Chem.* 256(3):1412-1419. (1981).
- Jarrol, E.L., Manning, P., Lindmark, D.G., Coggins, J.R. y Erlandsen, S.L. Giardia cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32:121-132. (1989).
- Kang, M.S., Elango, N., Mattia, E., Au-Young, J., Robins, P.W. y Cabib, E. Isolation of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 259:14966-14972. (1984).
- López-Revilla, R. y Rodríguez-Báez, J. Manual para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. (1981).

- Maeda, H. e Ishida, N. Specificity of binding of hexapiranosyl polisaccharides with fluorescent brightener. *J.Biochem.*62(2):276-278. (1967).
- 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.
- McConnachie, E. The morphology, formation and development of cysts of *Entamoeba*. *Parasitol.* 59:41-53. (1969).
- McMurrough, I. y Bartnicki-García, S. Properties of a particulate chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *J.Biol.Chem.* 246:4008-4016. (1971).
- Mirelman, D. y Avron, B. Cyst formation in *Entamoeba histolytica*. En Ravdin, J.I. Ed. *Amebiasis. Human Infection by Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons. New York, N.Y. (1988). cap.47: pp.768-781.
- Morales-Vallarta, M., Villarreal-Treviño, L., Ramírez-Bon, E., Said-Fernández, S. y Mata-Cárdenas, B. A method for encystation of *Entamoeba invadens*. *Proc.Microscopy and Microanalysis*. 916-917. (1995).
- Morales-Vallarta, M.R. Inducción de cuerpos cromatoides en trofozoítos que crecen en fase-log y diferenciación de *Entamoeba invadens* por alta tensión de CO₂. Aspectos en la formación de la pared del quiste. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. (1991).
- Neff, R.J. y Benton, W.F. Localization of cellulose in the cysts of *Acanthamoeba* sp. *J.Protozool.* 9:11. (1962).

- Orlean, P. Two Chitin Synthases in *Saccharomyces cerevisiae*. J.Biol.Chem. 262(12): 5732-5739. (1987).
- Potter, J.L., Weisman. Cellulose synthesis by extract of *Acanthamoeba castellanii* during encystment. Biochem.Biophys. Acta. 428:240-252. (1976).
- Ruíz-Herrera, J. y Xoconostle-Cázares, B. Molecular and genetic control of chitin biosynthesis in fungi. Arch.Med.Res. 26:(3)315-321. (1995).
- Rupley, J.A. The hidrolisis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molucular-weight substrates for lysozyme. Biochim.Biophys.Acta. 83:245-255. (1964).
- Said-Fernández, S., Vargas-Villarreal, J., Castro-Garza, J., Mata-Cardenas, B.D., Navarro-Marmolejo, L., Lozano-Garza, G. y Martínez-Rodríguez, H. PEHPS medium: An alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Trans.R.Soc. Trop.Med.Hyg. 82:249-253. (1988).
- Said-Fernández, S., Mata-Cárdenas, B.D., González-Garza, M.T., Rodríguez-Pérez, E. y Navarro-Marmolejo, L. *Entamoeba histolytica* cysts with a defective wall formed under axenic conditions. Parasitol.Res. 79:200-203. (1993).
- Sburlati, A. y Cabib, E. Chitin synthetase II, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. J.Biol.Chem. 261:15147-15152. (1986).
- Shavers, C.L., Parsons, M.L. y Deming, S.N. Simplex Optimization of Chemical Systems. J.Chem.Education. 56(5):307-309. (1979).

Silverman, S.J., Sburlati, A., Slater, M.L. y Cabib, E. Chitin synthase II is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 85:4735-4739. (1988).

Stecher, P.G. The Merk Index: An Encyclopedia of Chemical and Drugs. Merk and Co., Inc. Rahway, N.J, USA. Eighth Edition. (1968). p.501.

Tomlimson, G. y Jones, E.A. Isolation of cellulose from the cyst wall of soil amoeba. Biochem.Biophys.Acta. 63:194-200. (1962).

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

