UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EFECTO DE FACTORES QUIMICOS Y FISICOQUIMICOS SOBRE LA CALIDAD BIOLOGICA DE QUISTES DE *Entamoeba histolytica* FORMADOS EN CONDICIONES AXENICAS

POR

M.C.P. FRANCISCO GONZALEZ SALAZAR

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
con Especialidad en MICROBIOLOGIA

Septiembre 1998

TM
RC121
.A5
G6
c.1

1080087134

9452

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

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

POR

M.C.P. FRANCISCO GONZÁLEZ SALAZAR

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

Septiembre 1998

TM
RC121
.A5
T6
1996

BMU Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS

BU Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

TITULO DEL PROYECTO:

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

Aprobación por comité de tesis.

Dr. Salvador Said Fernández
Presidente

Dr. José María Viader Salvadó
Secretario

Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta
1er Vocal

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
2º Vocal

Dra. María Julia Verde Star
3er Vocal

El presente trabajo se realizó en:

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

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

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

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

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

Director de tesis:
Dr. Salvador Said Fernández

Asesores:
Dr. José María Viader Salvadó
Departamento de Bioquímica, ULIEG, Facultad de Medicina, UANL.
Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Departamento de Bioquímica, ULIEG, Facultad de Medicina, UANL
Dr. Mario R .Morales Vallarta
Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL
M.C. Eduardo Campos Góngora
División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste: IMSS.

Colaboradores:
Dr. Benito Mata Cárdenas
División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste: IMSS.
M.C. Juan Mora Galindo
División de Biología del Desarrollo, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Centro Médico de Occidente. IMSS, Guadalajara, Jal.
M.C. Enrique Ramírez Bon
Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UANL.

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DEDICATORIA

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

AL

Médico, Pediatra Rafael Villarreal Velázquez ✝-

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

A mis padres :

Sr. Francisco González González

y

Sra. María Andrea Salazar de González ✝

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

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

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo **Página**

1 Introducción

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

2 MATERIALES

2.1 Origen de los reactivos....11
2.2 Material Biológico....12
2.2.1 Amibas....12
2.3 Preparación de los medios de cultivo....12
2.3.1 Extracto de Hígado y Páncreas (EHP)....12
2.3.2 Preparación del medio PEHPS....13
2.3.3 Preparación y adición de suero bovino....13
2.3.4.Medio Basal Para Enquistamiento (MBE)....14
2.3.5 Preparación del medio ME20....15
2.3.6. Preparación del medio ME10....15
2.4 Composición y Preparación de las Soluciones....15
2.4.1 Solución basal de enquistamiento....15
2.4.2 Solución de Peptona....16
2.4.3 Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)....16
2.4.4 Soluciones 12x de $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CoCl_2$, $CaCl_2$ NaCl, Glucosa, Tetraborato de sodio y Manitol....17
2.4.5 Solución Salina de Enquistamiento (SSE)....18
2.4.6 Solución Amortiguadora de fosfatos de Sorensen....18
2.4.7 Solución de peróxido de hidrógeno....19
2.4.8 Solución Amortiguadora de Cacodilatos 0.1 *M*....19
2.4.9 Solución de Glutaraldehído....20
2.5 Preparación de los Detergentes....20
2.5.1 Dodecilsulfato de Sodio (SDS)....20
2.5.2 Sarcosyl al 0.2%....20

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo **Página**

2.6 Preparación de las Enzimas....21
2.6.1 Preparación de Mezcla Quitinasa y Tripsina....21

3 METODOS

3.1 Tratamiento del Material Para el Cultivo de Amibas....21
3.1.1 Lavado....21
3.1.2 Esterilización del Material....22
3.2 Cultivos Amibianos Axénicos....22
3.2.1 Curva de Crecimiento....22
3.2.2 Mantenimiento de las Cepas de Referencia....22
3.3 Enquistamiento....23
3.3.1 Estructuras semejantes a quístes de *E. histolytica* formadas de manera espontánea en MedioPEHPS (ESQ`s)...23
3.3.2 Inducción al enquistamiento....23
3.4 Cosecha de Quistes....23
3.5. Determinación del tiempo óptimo de enquistamiento....23
3.6 Pruebas de resistencia de quistes de *E. histolytica* a diferentes concentraciones de SDS....24
3.7 Selección de una cepa de *E. histolytica* capaz de enquistarse....24
3.8 Influencia del LCR y del PACSR sobre el enquistamiento....25
3.9 Evaluación de la calidad biológica de los quistes....25
3.9.1 La calidad biológica....25
3.9.2. La calidad global....27
3.9.3. La calidad global relativa....27
3.10 Optimación de un Medio por el Método Simplex....28
3.10.1 El método Simplex modificado para múltiples variables y múltiples respuestas....28
3.10.2 Preparación de los medios de enquistamiento durante la optimación....33
3.11 Método para evaluar la influencia del H_2O_2 sobre el enquistamiento....34
3.11.1. Preparación del medio con H_2O_2....34
3.12 Método para determinar la influencia del sedimento sobre el enquistamiento....35
3.12.1 Preparación de los medios de enquistamiento con y sin sedimento....35
3.13 Preparación de los quistes para microscopía electrónica....35

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo **Página**

3.14 Método para determinar la capacidad de desenquistarse *in vitro* de los quistes formados en medio de enquistamiento.....36

4 RESULTADOS

4.1 Estandarización de los medios de cultivo.....37
4.1.1 Curva de crecimiento de trofozoítos de *E. histolytica*.....37
4.1.2. Determinación del tiempo óptimo de producción de ESQR resistentes al efecto de SDS al 0.4 y 1%.....38
4.2 Selección de una cepa de *E. histolytica* capaz de enquistarse.....38
4.3 Determinación de la influencia del LCR y el PACSR sobre el enquistamiento.....39
4.4 Incremento de la calidad biológica de los quistes.....39
4.4.1 Incremento de la calidad global relativa durante la fase 1 de optimación.....39
4.4.2 Determinación de factores no esenciales para el enquistamiento de *E. histolytica*.....41
4.4.3 Optimación de las concentraciones de los factores que influyen en el enquistamiento de *E. histolytica* 42
4.4.4 Comparación de la calidad global de los quistes producidosen lafase 1 de optimación contra la calidad global de las ESQ formadas en medio PEHPS.....44
4.4.5 Comparación de las diferentes concentraciones de los factores en los medios donde se formaron los quistes con mejor, intermedia y peor calidad global de los quistes.....44
4.4.6 Optimación de la calidad global de los quistes de *E. histolytica* durante la fase 2.....45
4.4.7 Determinación de los valores y concentraciones óptimos de los factores durante la fase 2.....46
4.5 Influencia del H_2O_2 sobre el enquistamiento.....48
4.5.1 Determinación de la influencia de diferentes concentraciones molares de H_2O_2 sobre el potencial de óxido-reducción de los mejores medios de enquistamiento diseñados.....48
4.5.2 Determinación de la influencia del potencial de óxido-reducción del medio de enquistamiento sobre la calidad global de los quistes.....48
4.5.3 Comparación de la calidad global de los medios con H_2O_2 contra el testigo.....50
4.6 Influencia del sedimento sobre el enquistamiento.....50

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo **Página**

4.6.1 Comparación de la calidad global de los medios con sedimento y sin sedimento....50

4.7 Comparación de la calidad global de los quistes formados en los medios desarrollados en este trabajo....51

4.7.1 Calidad global de los quistes formados en los medios desarrollados....51

4.8 Rendimiento de los medios de enquistamiento desarrollados en este trabajo....52

4.8.1 Determinación del porcentaje de formación de quistes en los medios diseñados....52

4.9 Concentraciones y valores de los medios en que se forman quistes con mejor calidad global....52

4.9.1 Concentraciones de factores en los mejores medios de enquistamiento diseñados....52

4.9.2 Valores de condiciones fisicoquímicas de los medios donde se formaron los quistes de mejor calidad global....53

4.10 Aspecto microscópico de los quistes formados en el mejor medio de enquistamiento....54

4.10.1 Microscopía de luz de los quistes de *E. histolytica* formados en los medios desarrollados....54

4.10.2 La ultraestructura de los quistes formados en los medios desarrollados....58

4.11. Comparación del incremento de los porcentajes de quistes que cumplen con los parámetros de calidad biológica formados en los mejores medios diseñados con respecto a los porcentajes de las ESQ`s formadas en medio PEHPS....60

4.11.1 Incremento en los porcentajes de quistes que cumplen con los parámetros de calidad biológica....60

4.12 Determinación de la capacidad de desenquistarse....61

4.12.1. Determinación de la capacidad de desenquistamiento de los quistes formados en el medio 21p10....61

5 DISCUSION

5.1 Discusión....61

5.2 Conclusiones....72

5.3 Perspectivas....73

5.4 Contribuciones....74

6.1 Bibliografía....75

LISTA DE FIGURAS

Figura **Página**

1. Curva de crecimiento de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.....37

2. Relación temporal de formación de ESQR`s resistentes a SDS al 1%.....38

3. Incremento de la calidad global relativa de los quistes de *E. histolytica* por efecto de diez factores químicos. Se analizó el efecto de concentraciones variables de los siguientes factores: Suero bovino, glucosa, LCR, extracto de hígado y páncreas, mezcla de vitaminas 109 de Diamond, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Ca^{2+}, B^{3+}.....40

4. Identificación de factores no esenciales para el enquistamiento de *E. histolytica*.....41

5. Identificación de los factores esenciales para el enquistamiento y determinación de la concentración en la que se producen los quistes de mejor calidad global.....43

6. Incremento de la calidad global relativa de los quistes de *E. histolytica* por efecto de cuatro factores fisicoquímicos y un factor químico. Se analizó el efecto de condiciones variables de los siguientes factores: temperatura, pH, osmolaridad, potencial de óxido-reducción y concentraciones variables de fosfatos.....46

7. Identificación y determinación de los valores y concentraciones óptimas de los factores de la fase II.....47

8. Influencia de diferentes concentraciones de H_2O_2 sobre la calidad biológica de los quistes de E. histolytica formados en los medios 21 y 21-C.....49

9. Observaciones microscópicas de quistes, ESQ y trofozoítos en fotomicroscopio Axiophot con técnica de contraste de fases, aumento de 100x.....55

10 Observaciones en fotomicroscopio Axiophot con técnica de contraste de fases de trofozoítos, ESQ, ESQR y quistes, aumento de 100x.....57

11. Observaciones microscópicas de cortes semifinos de quistes de *E. histolytica* formados axénicamente en los medios 21, 21-C y 21p10, teñidos con tetraóxido de osmio y observados en fotomicroscopio Axiophot en campo claro y aumento de 100x.....58

12. Observaciones en microscopio electrónico de transmisión de los quistes formados en los medios 21, 21-C y 21p10 59

13. Incremento en los parámetros de calidad biológica en los quistes formados en los mejores medios diseñados.....60

LISTA DE TABLAS

Tabla **Página**

1 Volúmenes de las soluciones de Sorensen utilizadas para alcanzar diferentes valores de pH....19

2 Límites iniciales de concentraciones de factores durante la fase 1 de optimación....29

3 Concentraciones y valores iniciales de cada factor analizado durante la fase 2 de optimación....30

4 Influencia del LCR y PACSR sobre la calidad global de los quistes de *E. histolytica* formados en medio 10 en condiciones axénicas....39

5 Incremento en calidad global de los quistes formados en diferentes medios durante la fase 1 de optimación....44

6 Composición de los medios de enquistamiento con peor, intermedia y mejor calidad global durante la Fase 1 de optimación....45

7 Valores de potencial de óxido-reducción en medios con diferentes concentraciones de H_2O_2....48

8 Influencia del sedimento sobre la Calidad global en los medios con peróxido....51

9 Calidad global de los quistes formados en los medios desarrollados en este trabajo....51

10 Porcentaje de formación de quistes en medios diseñados....52

11 Composición de los medios en que se forman los quistes con mejor calidad global....53

12 Condiciones fisicoquímicas de los medios donde se produjeron los quistes con mejor calidad global....53

NOMENCLATURA

B^{3+}	Ion boro
C	Valores promedio
°C	Grados Celsius
$CaCl_2$	Cloruro de calcio
c.b.p.	Cuanto baste para
CH_3COONa	Acetato de sodio
cm	Centímetros
CO_2	Dióxido de carbono
$CoCl_2$	Cloruro de cobalto
cols	Colaboradores
DNA	Acido desoxiribonucleico
EHP	Extracto de hígado y páncreas
ESQ	Estructuras semejantes a quistes
ESQR	Estructuras semejantes a quistes resistentes al efecto de SDS al 1%
Fig	Figura
g	Gramos
h	Horas
HCl	Acido clorhídrico
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
K	Variables
KCl	Cloruro de potasio
K_2CO_3	Carbonato de potasio
K_2HPO_4	Fosfato de potasio dibásico
KH_2PO_4	Fosfato de potasio monobásico
KOH	Hidróxido de potasio
L	Litros
LCR	Preparado comercial rico en lípidos y colesterol
M	Concentración molar

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

pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SSE	Solución salina de enquistamiento
u	Unidades enzimáticas
Vit	Mezcla de vitaminas # 109 de Diamond

RESUMEN

Franciso González Salazar **Fecha de graduación : Septiembre, 1998**

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Título del Estudio: **EFECTO DE FACTORES QUÍMICOS Y FISICOQUÍMICOS SOBRE LA CALIDAD BIOLÓGICA DE QUISTES DE *Entamoeba histolytica* FORMADOS EN CONDICIONES AXÉNICAS**

Número de páginas: 101 **Candidato para el grado de maestría en ciencias con especialidad en Microbiología**

Area de estudio: Microbiología médica

Propósito y método de estudio:

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

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

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

Contribuciones y conclusiones:

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

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

Firma del Asesor _____

Dr. Salvador Said Fernández