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

4.4.7 Determinación de los valores y concentraciones óptimos de los factores durante la fase 2

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

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

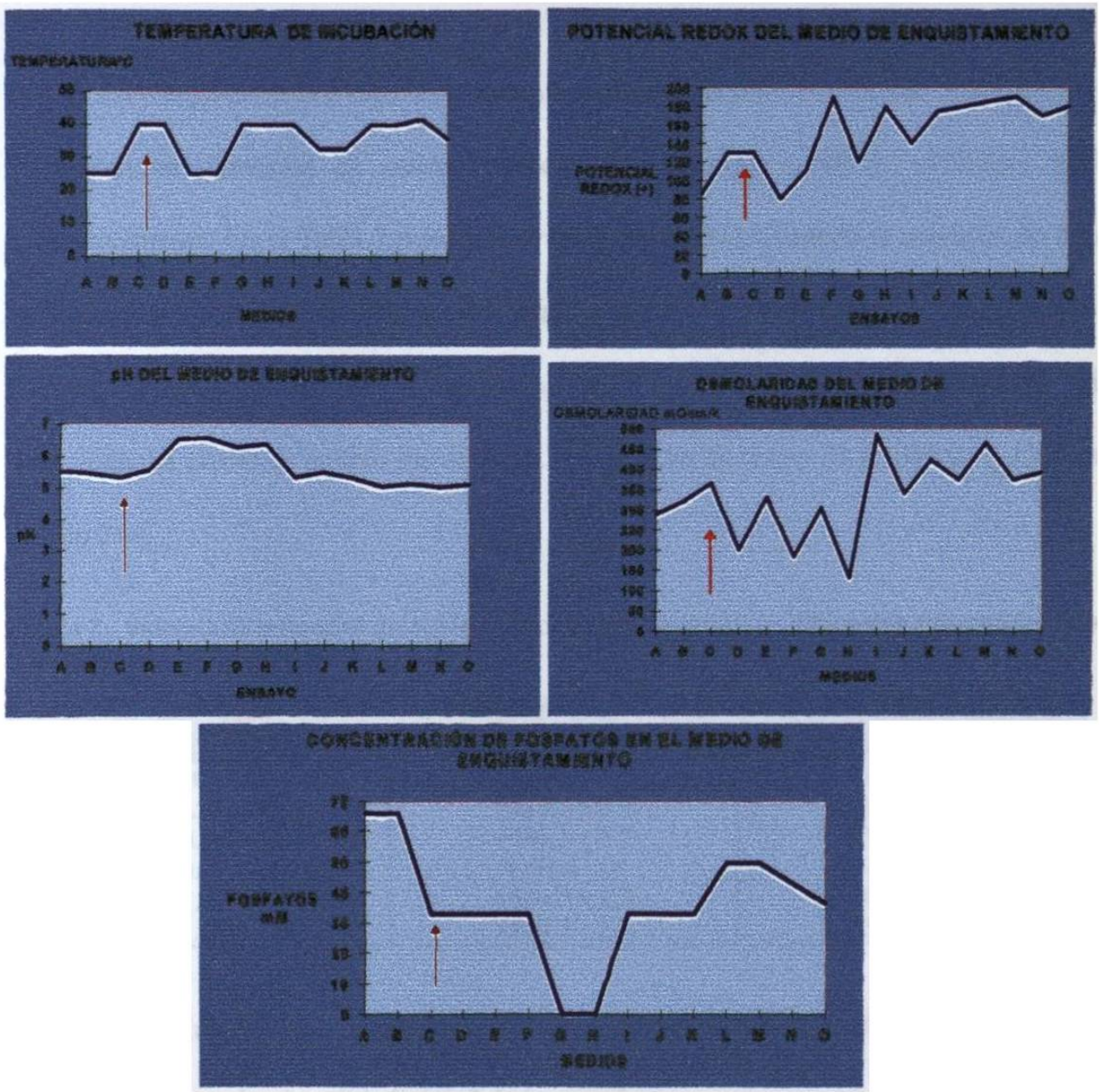

Figura 7.- **Identificación y determinación de los valores y concentraciones óptimas de los factores de la fase II.** En la Fig.6 se muestra que en el medio 21-C se produjeron los quistes con mejor calidad global. Obsérvese que las fluctuaciones en los valores de pH, osmolaridad, temperatura, potencial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

4.5 Influencia del H_2O_2 sobre el enquistamiento.

4.5.1 Determinación de la influencia de diferentes concentraciones molares de H_2O_2 sobre el potencial de oxido reducción de los mejores medios de enquistamiento diseñados.

Los mejores medios diseñados durante la fase 1 (medio 21) y la fase 2 (medio 21-C) mostraron un potencial de oxido reducción de +110mv ± 10 y +156.7mv ± 7.6 respectivamente. En la Tabla 7 puede observarse como se incrementó el potencial do óxido reducción en función directa de la concentración de H_2O_2 en el medio de enquistamiento. Cuando se agregaron 0.5 ml de una solución de H_2O_2 1.35 mM el potencial de óxido reducción del medio de cultivo fue de +210.7mv ± 5.1en el medio 21 y +365mv ± 13.2 en el medio 21-C.

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

Concentración mM de H_2O_2	Potencial de óxido-reducción (mv)	
	Medio 21	Medio 21-C
0	+110 ± 10	+156,7± 7.6
0.27	+125,7 ± 5.1	+226,7 ± 5.8
0.54	+145,7 ± 8.1	+253,7 ± 7.8
0.81	+168,0 ± 8	+371,7 ± 16.1
1.08	+194,3 ± 4.5	+362,3 ± 13.7
1.35	+210,7 ± 5.1	+365,0 ± 13.2

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

La mejor calidad global de los quistes se produjo en los medios 21 con 0.54 y 1.35 mM de H_2O_2 correspondientes a +145,7 ± 8.1mv y +210,7 ± 5.1mv. También el medio 21-C con 0.81 mM de H_2O_2 y potencial de óxido-reducción de +371,7 ± 16.1mv (Fig.8). Este último medio también es un medio bifásico. La calidad global de los quistes alcanzada con estos tres medios fue de 0.681 ± 0.042 para el medio con +145,7mv de 0.684 ± 0.042 para el medio con +210,7 mv y 0.648 ± 0.06 para el medio con +371,7mv.

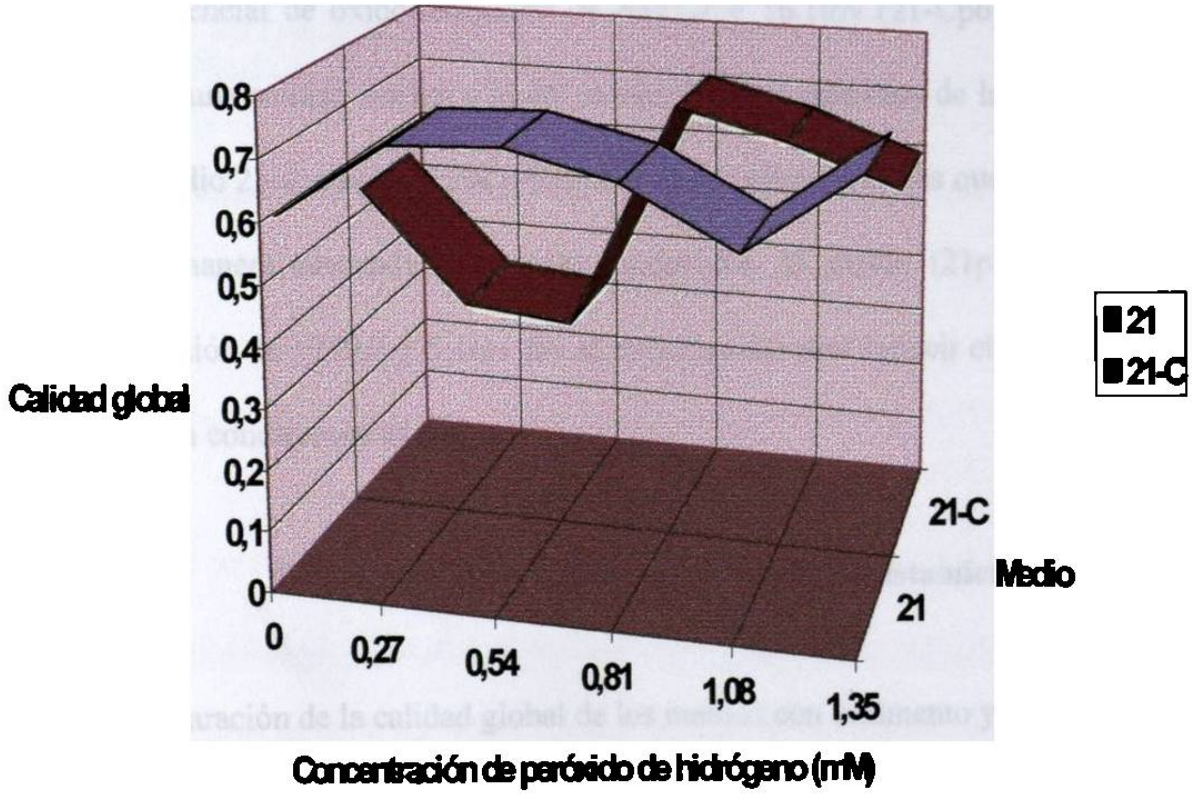

Figura 8.- Influencia de diferentes concentraciones de H_2O_2 en los medios 21 y 21-C. Los mejores medios diseñados con el método Simplex (21 y 21-C) se adicionaron con diferentes concentraciones de peróxido y se prepararon en medio basal sin agentes reductores (ácido ascórbico y L- cisteína). Los trofozoítos en fase de crecimiento logarítmico se incubaron en estos medios a 40ºC por 7 días. A los quistes así producidos se les evaluó la calidad global, como se describe en la Fig.3. La mejor calidad global de los quistes se produjo en los medios 21 con 0.54 y 1.35 mM de H_2O_2 correspondientes a +145,7 ± 8.1mv y +210,7 ± 5.1mv. También el medio 21-C con 0.81 mM de H_2O_2 y potencial de óxido-reducción de +371,7 ± 16.1mv

4.5.3. Comparación de la calidad global de los medios con H_2O_2 contra el testigo.

El medio 21 con 0.54 mM de H_2O_2 con potencial de óxido-reducción de +145,7 ± 8.1mv (21p4) y el medio 21 con 1.35 mM de H_2O_2 con potencial de óxido-reducción de +210,7 ± 5.1mv. (21p10), mostraron un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en la calidad global con respecto al testigo y con un medio de apariencia translúcida y monofásico. Mientras el medio 21-C no incrementó su calidad global al agregar H_2O_2 0.81 mM con potencial de óxido-reducción de +371,7 ± 16.1mv (21-Cp6). Además aunque el testigo tenía una calidad similar a la del medio 21 con cualquiera de las concentraciones de H_2O_2. El medio 21-C con y sin H_2O_2 fueron medios bifásicos en los que el sedimento impide separar de manera adecuada los quistes producidos. El medio (21p10) con potencial de óxido-reducción de +210,7 ± 5.1mv fue el mejor medio para inducir el enquistamiento de *E. histolytica* en condiciones axénicas.

4.6 Influencia del sedimento sobre el enquistamiento.

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

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

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

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

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

[a] De los quistes formados en los medios.
[b] Medio bifásico con sedimento.
[c] Medio aspirado sin sedimento.
[d] Medio 21 + 0.54 mM de H_2O_2.
[e] Medio 21-C + 0.81 mM de H_2O_2.
[f] Medio 21 + 1.35 mM de H_2O_2.

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

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

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

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

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

[a] Promedio de tres ensayos ± error estándar.
[b] Para una prueba *t* de student de una cola con respecto al testigo.
[c] $p < 0.05$ diferencias estadísticamente significativas.
[*] Medio 21 con 1.35 mM de H_2O_2.

4.8 Rendimiento de los medios de enquistamiento desarrollados en este trabajo

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

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

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

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

[*] Concentración 0.54, 1.35 y 0.81 mM de H_2O_2. respectivamente.
[a] Promedios de tres ensayos ± error estándar.
[b] Los valores de p para los promedios de los rendimientos de estos medios no mostraron diferencias significativas en una prueba t de student de 2 colas $p = o > 0.05$.

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

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

Como se observa en la Tabla 11 las concentraciones de suero bovino, glucosa, Mg^2, Mn^{2+}, Co^{2+}, Ca^{2+}, B^{3+} establecidos durante la primera fase de optimación no se modificaron. Además nótese como se eliminaron del medio de enquistamiento los factores reductores (ácido ascórbico y L- cisteína) y los fosfatos. Así el mejor medio contiene las mismas concentraciones de factores que el medio 21 más H_2O_2. 1.35 mM pero sin agentes reductores.

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

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

[a] Concentración mM

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

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

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

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

[a] Valores promedio de tres ensayos
[b] En grados centígrados
[c] Expresada en mOsm/kg
[d] Expresada en mv

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

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

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

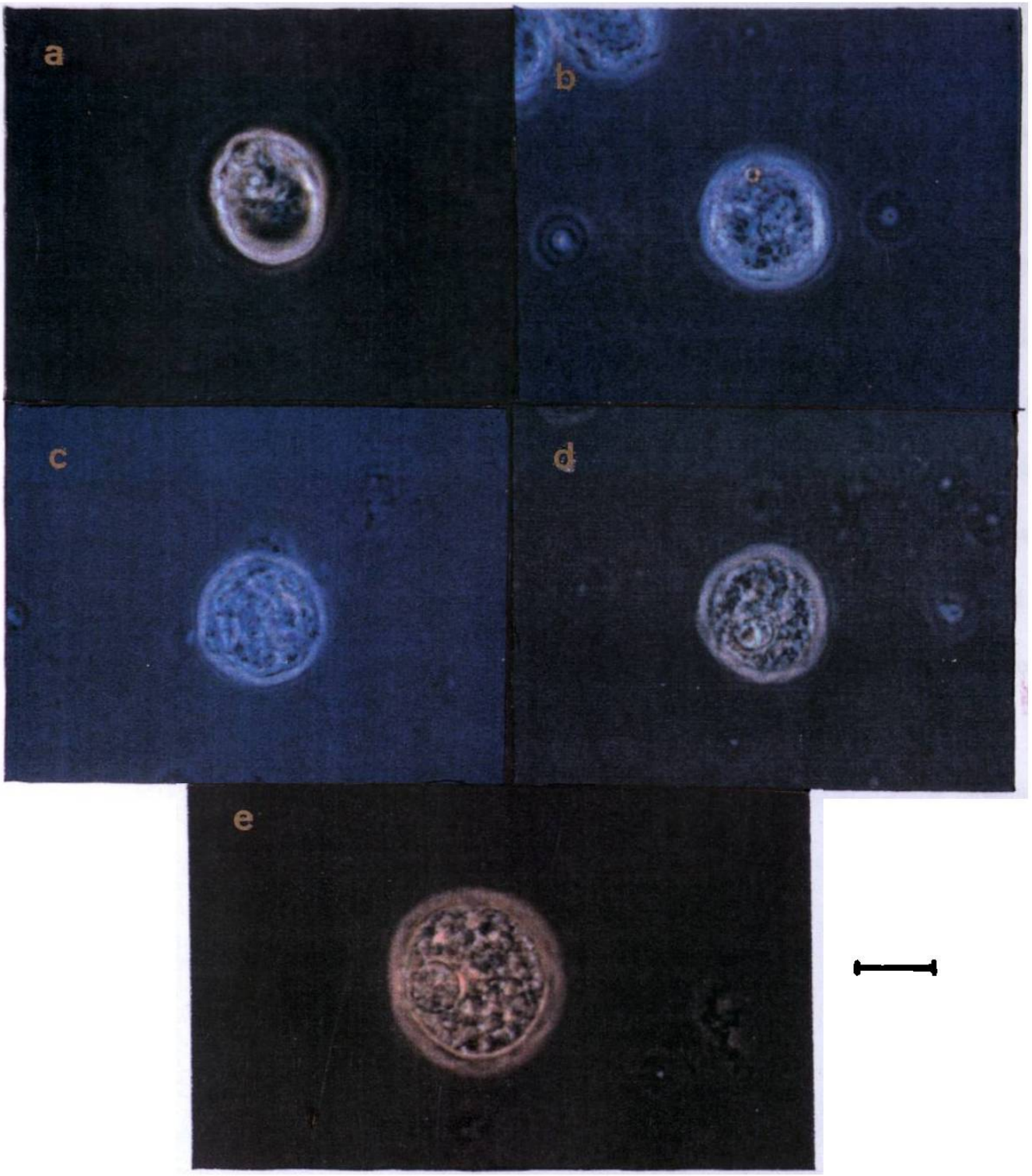

Figura 9.- Observaciones microscópicas en fotomicroscopio Axiophot con técnica de contraste de fases, aumento de 100x de trofozoítos (A), ESQ`s (B), quistes formados en medio 21 (C), quistes formados en medio 21-C (D) y quistes formados en medio 21p10 (E). Donde pudimos observar como los quistes formados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

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

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

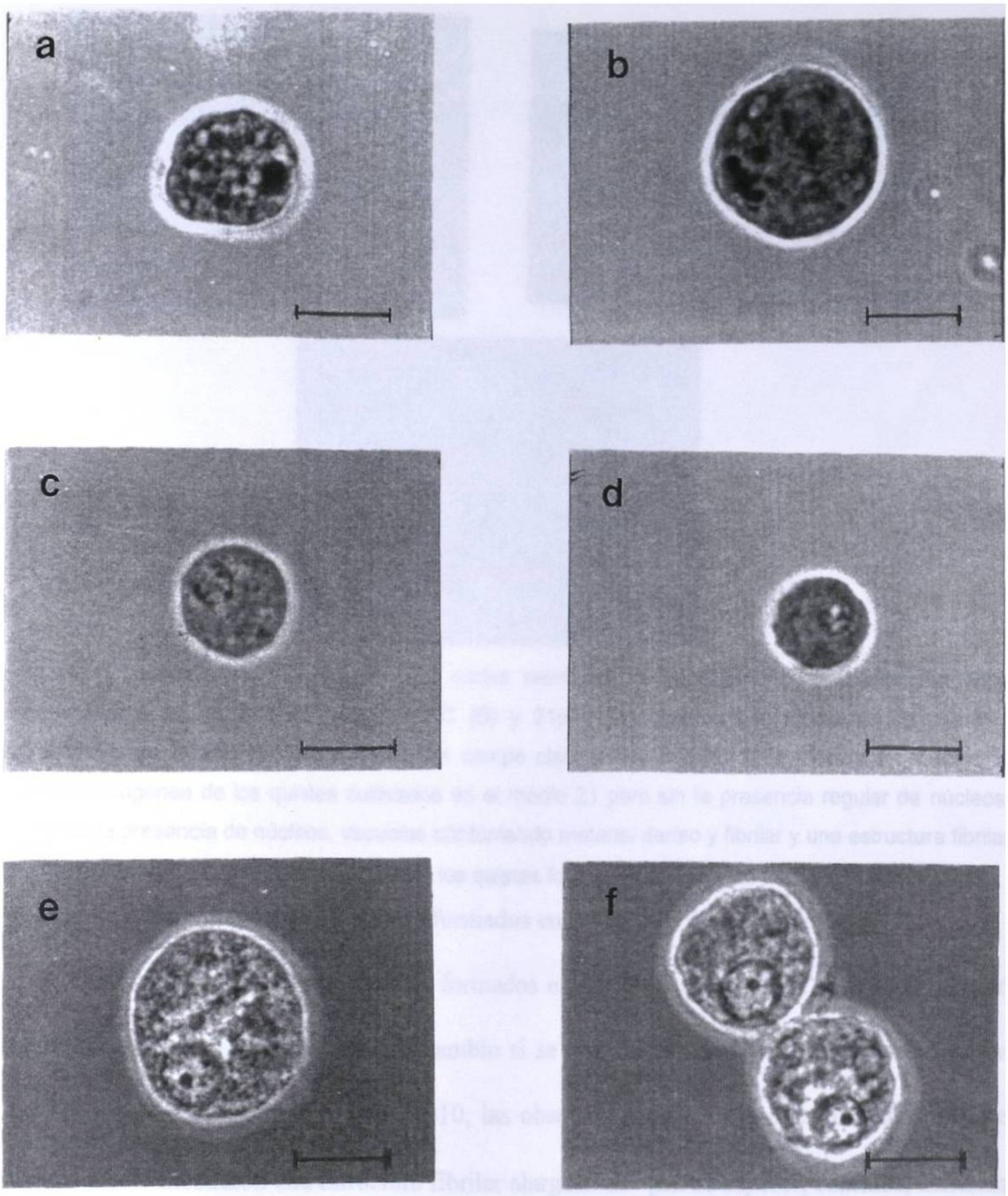

Fig 10.- Observaciones en fotomicroscopio Axiophot con técnica de contraste de fases aumento de 100x de trofozoítos (A), ESQ`s (B), ESQR`s formadas en medio ME10 (C) y ME20 (D) y quistes formados en medio 21p10 (E y F). Donde se observó que a diferencia de las otras estructuras en esta figura los quistes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

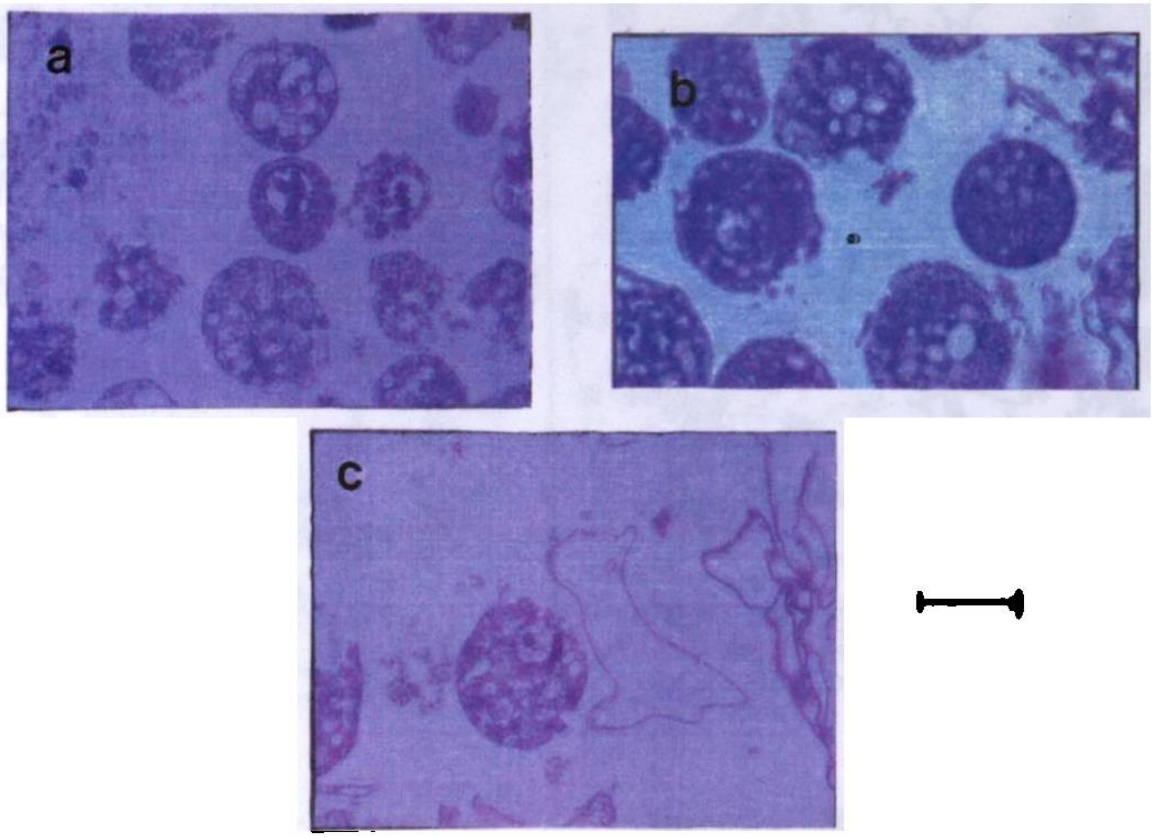

Fig 11.- Observaciones microscópicas de cortes semifinos de quistes de *E. histolytica* formados axénicamente en los medios 21 (A), 21-C (B) y 21p10 (C), teñidos con tetraóxido de osmio y observados en fotomicroscopio Axiophot en campo claro y aumento de 100x. Donde se observó la forma homogénea de los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

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

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

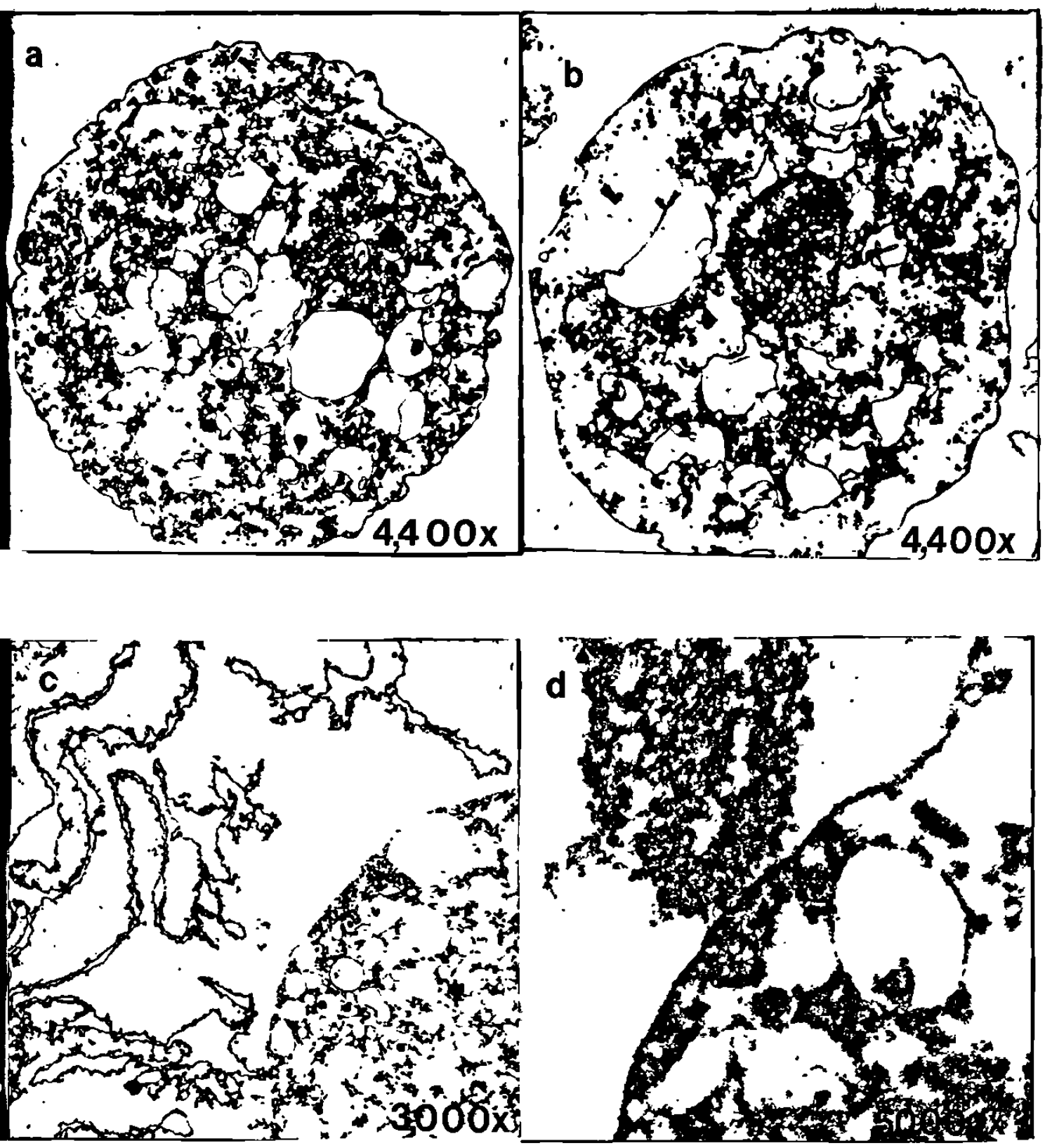

Figura 12.- Observaciones en microscopio electrónico de transmisión de los quistes formados en los medios 21 (A), 21-C (B) y 21p10 (C y D). Donde se puede observar la ausencia de cuerpos cromatoides en los quistes formados en todos los medios, la falta de pared celular en los quistes producidos en los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

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

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

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

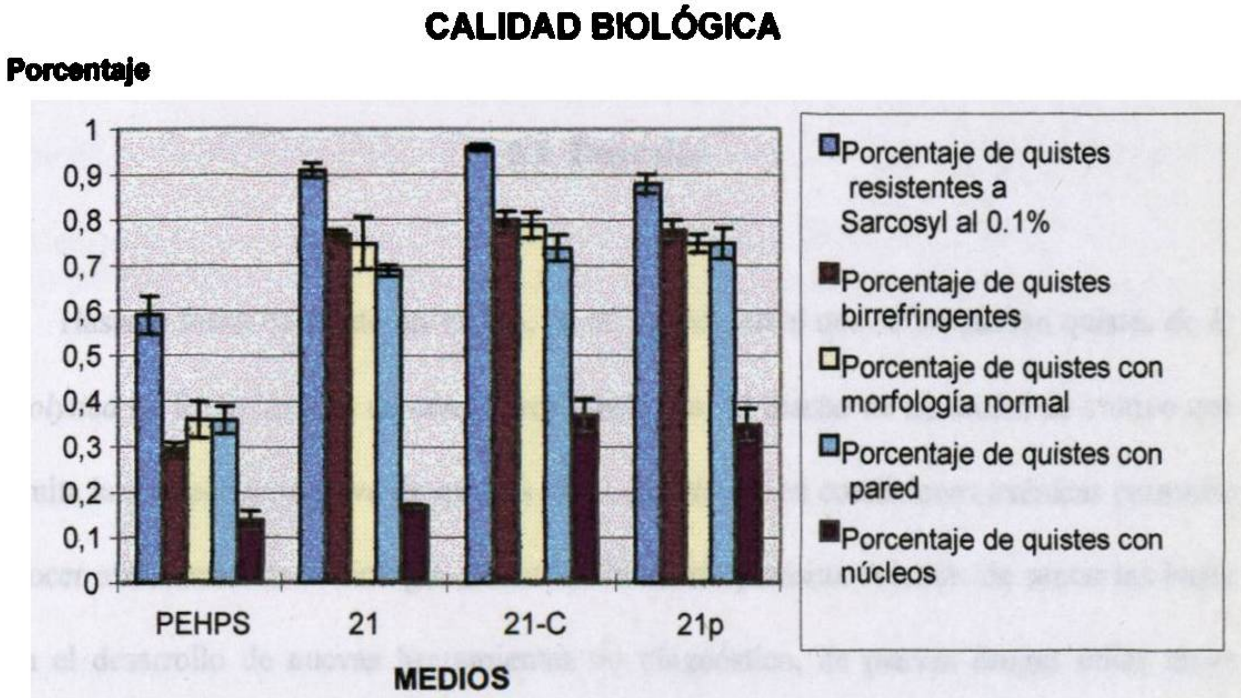

Fig 13.- Análisis del incremento en los parámetros de calidad biológica en los mejores medios diseñados. Los porcentajes de quistes que cumplían con cada uno de los factores de calidad biológica por separado se evaluaron en los mejores medios diseñados. Graficándose los promedios de los porcentajes de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

4.12 Determinación de la capacidad de desenquistarse

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

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

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

5.1 Discusión

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

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

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

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

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

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

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

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

El método Simplex es un modelo matemático que permite evaluar la interacción de varios factores sobre una respuesta determinada. Este método se utiliza rutinariamente en la industria y ha sido utilizado en investigaciones biomédicas con buenos resultados(Campos-Góngora E, 1996, Escamilla-Treviño L.L., 1996). En nuestro trabajo se utilizó el método Simplex modificado para múltiples variables y múltiples respuestas, permitiéndonos alcanzar nuestros objetivos con eficiencia en un período corto de tiempo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cuando se analiza la estructura ultramicroscópica de los quistes de *E. histolytica* formados en condiciones axénicas en el medio 21p10. Llama la atención la presencia de una estructura fibrilar continua y adosada a la membrana celular solo en pequeños tramos. Por estas características nosotros proponemos que esta estructura se trata de la pared celular. La cuestión es: ¿Por que se desprende casi por completo de la membrana celular de los quistes? Existen por lo menos dos posibles explicaciones: La primera es de que se haya formado la pared y por algún motivo las técnicas de fijación inadecuadas aunadas a la desecación y las centrifugaciones repetidas hayan dañado la ultraestructura de la pared posterior a la observación en fresco. Esta es una posibilidad aceptable dado que en las preparaciones en fresco observadas con contraste de fases no encontramos paredes desprendidas (Fig 9 y 10). Otra posibilidad es el H_2O_2 inicialmente pudo haber inducido al enquistamiento pero posteriormente causrr daño por oxidación dañando a las estructuras celulares irreversiblemente, lo que produjo los cambios observados en los quistes.

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

analizando el efecto de otros factores. Por ejemplo Morales Vallarta y cols encontraron que en PEHP saturado con CO_2 se forman estructuras parecidas a quistes de *E: histolytica* en condiciones axénicas que tienen cuerpos cromatoides(Morales-Vallarta M, 1995). Como los quistes formados en el medio 21p10 no tienen estas estructuras, será muy interesante investigar si preincubando los trofozoítos en medio PEHP saturado con CO_2 y luego induciendo el enquistamiento en medio 21p10 se forman quistes con cuerpos cromatoides y una pared más estable. Por otro lado queda claro que las condiciones oxidantes del medio inducidas por H_2O_2 favorecieron notablemente la síntesis de una estructura que sugiere ser una pared gruesa pero lábil. Es importante investigar el efecto del tiempo de exposición a estas condiciones oxidantes y el efecto del potencial de oxido-reducción sobre la estabilidad de la pared.

5.2 CONCLUSIONES

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

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

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

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

5.3 PERSPECTIVAS

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

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

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

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

5.4 CONTRIBUCIONES

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

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

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

6.1 BIBLIOGRAFIA

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

Arroyo-Begovich, A., Carabez-Trejo, A. y Ruiz-Herrera, J. Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. J. Parasitol. 66: 735-741. (1980).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Diamond, L.S. Cultivation of *Entamoeba histolytica:* A historical perspective. En Kretschmer R.R. ed. Amebiasis: Infection and Diseases by *Entamoeba histolytica*. Boca Raton, Flo: CRC Press Inc. USA. (1990) cap 2 : pp. 11-17.

Erlandesen, S.L., Bemrick, W.J., y Pawley, J. High- resolution electron microscopic evidence for the filamentous estructure of the cyst wall in *Giardia lamlia* duodenalis J. Parasitol. 75: 787-797 (1989).

Escamilla-Treviño, L.L. Biosíntesis de hormona del crecimiento humana recombinante (HaHr). en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Tesis de maestría, Facultad de medicina, UANL. (1996).

Farkas, V. Biosinthesis of cell wallof fungi. Microbiology Rev. 43 (suppl. 2): 117-144 (1979).

Gutiérrez G. Investigaciones Mexicanas sobre vacunas. Amibiasis. Boletín mensual de Epidemiología. 2 (11): 135-137 (1987)

Garcia-Manzo, N.T., Escandon-Romero, C., Cabral-Soto, J., Escobedo-De La Peña, J., Olvera-Alvarez, J., Silva-Batalla, A. Patterns of the morbility and mortality of Amebiasis and amebic liver abscess in Mexico: An ecological analysis. Arch. of Med. Reseach.; 28 (suppl): 290-292. (1997)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Potter, J.L., Weisman. Cellulose synthesys by extract of Acantamoeba castellanii during encystment. Biochem. Biophis. Acta.; 428: 240-252 (1976).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Zhang, T. and. Stanley, S.L. Progress in an oral vaccine for Amebiasis. Expresión of the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) in the avirulent vaccine strain *Salmonella typhi* TY2 χ4297 (▲ *cya*, ▲ *crp*, ▲ *asd*): safety and immunogenicity in mice. Arch. Med. Res. 28 (Suppl.): S269-271 (1997).