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

INDUCCION *IN VITRO* DE FORMAS SEMEJANTES A QUISTES EN CULTIVOS AXENICOS DE *Entamoeba histolytica*

TESIS

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

PRESENTA

Q.B.P. MARIA PORFIRIA BARRON GONZALEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. MAYO DEL 2002

INDUCCION *IN VITRO* DE FORMAS SEMEJANTES A QUISTES EN CULTIVOS AXENICOS DE *Entamoeba histolytica*

TM
RA121
.A5
B3
2002
c.1

MPBG

1080124337

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

INDUCCION *IN VITRO* DE FORMAS SEMEJANTES A QUISTES EN CULTIVOS AXENICOS DE *Entamoeba histolytica*

T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

Q.B.P. MARIA PORFIRIA BARRON GONZALEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. MAYO DEL 2002

TM
RA121
.A5
B3
2002

P.U. Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

"INDUCCIÓN *IN VITRO* DE FORMAS SEMEJANTES A QUISTES EN CULTIVOS AXÉNICOS DE *Entamoeba histolytica*"

Aprobación por comité de Tesis

Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta.
DIRECTOR

Dra. Licet Villarreal Treviño
SECRETARIA

Dr. Benito David Mata Cárdenas
DIRECTOR EXTERNO

Dr. Javier Vargas Villarreal
VOCAL

Dr. José Antonio Heredia Rojas.
VOCAL

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Celular y en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, Departamento de Biología Celular y Genética, y el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Mario R. Morales Vallarta y Dr. Benito D. Mata Cárdenas.

" Al Maestro de maestros "

A mis padres, con cariño

Sr. Genaro Barrón Salas

Sra. Ma. del Refugio González Alvarado.

A toda mi familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

Al ***Dr. Mario R. Morales Vallarta*** por brindarme su amistad, su tiempo, valiosas enseñanzas, y una excelente dirección durante el transcurso del presente trabajo.

Al ***Cand. Dr. Jorge A. Verduzco Martínez***, por brindarme todo su apoyo, paciencia y confianza para que este trabajo se realizara.

Al ***Dr. Benito D. Mata Cárdenas*** del Departamento de Biología Celular de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste del IMSS por sus consejos, apoyo y facilidades para la realización de este trabajo.

A la ***Dr. Licet Villarreal Treviño***, por todo su apoyo, sugerencias y cooperación para la realización de este trabajo y por ser guía durante mi carrera.

A la ***Dra. Diana Resendez Pérez***, Jefe del Departamento de Biología Celular y Genética, por su valiosa cooperación y apoyo.

A la ***Dra. Julia Verde Star*** y a la ***Dra. María Luisa Rodríguez Tovar*** por todo el apoyo brindado durante mi post-grado

Al ***Q.F.B. Enrique Ramírez Bonn*** del Departamento de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. y a Petrita por su valiosa ayuda.

Al ***M.C. José Antonio Heredia Rojas*** por su valiosa y desinteresada cooperación y por su amistad.

Al ***Cand. Dr. J. Claudio Moreno Rocha*** por su valiosa cooperación en la obtención de las fotografías en el microscopio confocal.

A todas las personas que me apoyaron de una u otra forma a la realización de este trabajo.

También agradezco el apoyo brindado por ***PAYCIT*** (Proyecto CN482-01) para la elaboración de esta tesis

-Histamina 0.6mM.....17
-Calcoflúor 1.0%.....17
-Sarcosyl 0.15%.....17
-Tioglicolato 0.87mM.....17
3.- Medios de cultivo
TYI-S-33.....18
PEHP.....18
PET.....19
MÉTODOS
A).-Mantenimiento de la cepa.....19
B).-Rendimiento celular y cinéticas de crecimiento de *E. histolytica*, crecida en 19
distintos medios utilizando suero irradiado, suero filtrado o PACSR
C).-Cinética comparatica de crecimiento de *E. histolytica* con y sin CO_2 en el.....20
medio PEHP adicionado con suero irradiado.
D).-Inducción del enquistamiento de *Entamoeba histolytica*, empleando el método.....20
de alta tensión de CO_2 (Método Normal)
E).-Efecto de la histamina, medios condicionados con enterobacterias y CO_2 en 20
el pH del medio PEHPS y en el medio PETS
F).-Inducción de enquistamiento de *E. histolytica*, empleando el método de alta.....20
tensión de CO_2 (Método modificado)
G).-Efecto del pH en la inducción de formas resistentes a detergente.....23
H).-Diseño experimental.....23
I).-Procesamiento estadístico.....24

RESULTADOS
A).-Rendimiento celular y cinéticas de crecimiento de *E. histolytica*, crecida 25
en distintos medios utilizando suero irradiado, suero filtrado o PACSR.
B).-Cinética comparativa de crecimiento de *E. histolytica* con y sin CO_2 en el.....28
medio PEHP adicionado con suero irradiado.
C).-Efecto de la histamina, CO_2 y medios condicionados con enterobacterias.....29
en el pH del medio PEHP y en el medio PETS.

D).-Comparación del rendimiento del enquistamiento de *E. histolytica*.....29
empleando el método con alta tensión de CO_2 y el mismo medio
modificado con diferentes condiciones.
-Modificaciones al método original.....29
-Modificaciones en el método original y en el medio de cultivo.....30
-Características morfológicas de las estructuras semejantes a quistes.....30

DISCUSIONES.....37
PERSPECTIVAS.....38
CONCLUSIONES.....38
BIBLIOGRAFÍA.....39

LISTA DE ABREVIATURAS

Mililitro.....mL
milímetros.....mm
Milimolar.....mM
Microlitro..... µL
Microgramos..... µg
Gramos.....g
Concentración Normal.....N
Minutos.....min
Horas.....h
Potencial de Hidrógeno.....pH
Grados centígrados.....°C
Revoluciones por minuto.....rpm
Porciento.....%
Medio formado por la combinación .....PET
de los medios ***PEHP y TYI-S-33***
Medios PET adicionados con suero.....PETS
Medios PET adicionados con PACSR.....PETP
Protein Axenic Culture Serum Repleacement.....PACSR
(solución sustituto del suero)
Concentración.....Conc.
Figura.....Fig.
Página.....Pág.
Suero esterilizado por radiación.....SI
Suero esterilizado por filtración.....SF
Células.....Cél.
Tioglicolato.....Tigo.
Histamina.....Hist.
Libras.....Lb
Pulgadas cuadradas..... $Pulg^2$
Experimentos.....exps.

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1.- Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.....4

Figura 2.- Posición taxonómica de *Entamoeba histolytica* de acuerdo a la Comisión.....5
Internacional de Nomenclatura Zoológica.

Figura 3.- Posición filogenética de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba invadens* 10

Figura 4.- Estructura química de la quitina.....11

Figura 5.- Método con alta tensión de CO_2 para el enquistamiento de 21
Entamoeba histolytica.

Figura 6.- Método modificado con alta tensión de CO_2 para el enquistamiento de.....22
Entamoeba histolytica.

Figura 7.- Cinéticas de crecimiento de *Entamoeba histolytica* en los medios TYI 27
o PET en presencia de suero filtrado, suero irradiado o PACSR.

Figura 8.- Cinética de crecimiento de *E. histolytica* en presencia y ausencia de CO_2 28

Figura 9.- Formas resistentes a sarcosyl de *Entamoeba histolytica* que muestran su 31
característica capacidad de adherirse entre ellas.

Figura 10.-Corte semifino de estructuras semejante a quiste de *E. histolytica,* en.....32
el cual se observan estructuras polinucleadas (7200 X).

Figura 11.- Fotografía al microscopio electrónico de una estructura semejante a.....33
quiste de *E. histolytica* en la cul se observa la presencia de cuerpos
cromatoides o hélices de ribonucleoproteinas (flechas) (30,000X).

Figura 12.- Fotografía al microscopio electrónico de una estructura semejante a..... 34
quiste de *E. histolytica* en la cual se observa la presencia de cuerpos
cromatoides o hélices de ribonucleoproteinas y la presencia de una
incipiente pared celular (flecha). (12,000X).

Figura 13.- Formas semejantes a quistes de *E. histolytica* resistentes a sarcosyl.....35
0.15% observadas con microscopio confocal. a) Células en contraste
de fase. B) las mismas tratadas con calcoflúor M2R observadas con
microscopía de fluorecensia. La fluorescencia de fondo ha sido eliminada.

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1.- Composición del medio TYI para el cultivo de *Entamoeba histolytica*.....18

Tabla 2.-. Composición del medio PEHP para el cultivo de *Entamoeba histolytica*.....18

Tabla 3.- Composición del medio PET para el cultivo de *Entamoeba histolytica*.....19

Tabla 4.- Comparación del pH de los medios PEHP y PET antes y después de su.....25
esterilización.

Tabla 5.- Comparación del rendimiento celular obtenido en el medio PEHP utilizando..... 25
suero irradiado, suero filtrado o PACSR

Tabla 6.- Comparación del rendimiento celular obtenido en el medio TYI utilizando..... 26
suero irradiado, suero filtrado o PACSR

Tabla 7.- Comparación del rendimiento celular obtenido en el medio PET utilizando..... 26
suero irradiado, suero filtrado o PACSR

Tabla 8.- Comparación del rendimiento celular obtenido en los medios PET,PEHP y..... 29
TYI utilizando suero irradiado.

Tabla 9.- Comparación de resultados con las diferentes condiciones para inducir.....36
las formas semejantes a quistes de *Entamoeba histolytica*

RESUMEN

El protozoario *Entamoeba histolytica* es el agente etiológico de la disentería amibiana ocasionada por la ingestión de quistes, que constituyen la forma resistente e infectiva. El estudio del enquistamiento de *E. histolytica* tiene especial interés, ya que el conocimiento de los mecanismos bioquímicos implícitos en éste proceso favorecerían investigaciones futuras para prevenir la formación o germinación del quiste y el control de la amibiasis a nivel del medio ambiente. Sin embargo, hasta ahora el enquistamiento de *E. histolytica* no se ha podido lograr *in vitro*, por lo cual planteamos la hipótesis siguiente: El método con alta tensión de CO_2 desarrollado en nuestro laboratorio para inducir el enquistamiento con *Entamoeba invadens*, una amiba de reptiles que produce los mismos síntomas que *E. histolytica* en humanos, puede también inducir la formación de quistes o formas semejantes a quistes en *Entamoeba histolytica* si se combina con algunos de los factores que inducen enquistamiento en *E. invadens* . El objetivo de este trabajo fue el desarrollar un medio o método que produzca altos rendimientos de quistes o formas semejantes a quistes en *Entamoeba histolytica.* El medio de crecimiento utilizado fue el medio PETS. (formado por una combinación de los medios PEHPS, TYI-S-33 y suero), el cual produjo mejor rendimiento que los medios PEHPS y TYI-S-33. Trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS se incubaron con 2 x 10^4 cel/mL en tubos de 16x150 mm con tapón de rosca, cada uno con 10 mL del medio PETS a un pH de 7, suero irradiado y gaseados con CO_2. Se incubaron a 37°C; después de 3 días el medio fue sustituído con el mismo medio PETS sin glucosa a un pH de 8, pero adicionado con histamina 0.6 mM, medios condicionados estériles de *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis* y suero irradiado; se procedió a gasear con CO_2 y se incubó a 37°C por 4 días. El porciento de rendimiento fue de 91.4% de formas semejantes a quistes resistentes a Sarkosyl 0.15%. En un segundo ensayo se empleo el mismo procedimiento pero el suero fue sustituido por la mezcla de lípidos-aminoácidos (PACSR), obteniendo un 90.0% de rendimiento de formas semejantes a quistes resistentes a sarkosyl 0.15%. Las formas quísticas tratadas con calcoflúor fluorescen con luz UV. fluorecieron. Concluimos que: A) La mezcla de los medios PEHP, TYI (medio PET) permite obtener mayor rendimiento en el crecimiento de trofozoítos de *E. histolytica*, B) El suero irradiado puede ser sustituido por la mezcla de lípidos-aminoácidos (PACSR) para producir altos rendimientos de formas semejantes a quistes resistentes a sarkosyl 0.15%. c) Las formas semejantes a quistes resistentes a sarkosyl fluorecsen con LUV en presencia de calcoflúor M2R.