INTRODUCCIÓN

La amibiasis es una enfermedad parasitaria infecciosa del tracto gastrointestinal, ocasionada por el protozoario *Entamoeba histolytica* con o sin síntomas clínicos, representa un problema de salud mundial y afecta principalmente a los países en vías de desarrollo, con mayor frecuencia en las regiones tropicales, con climas cálidos y templados y con mayor orientación en las áreas pobres y mal saneadas en donde de forma habitual predomina la desnutrición, el hacinamiento y un manejo inadecuado de las aguas en general y de las excretas, haciendo frecuente tanto la infección como la enfermedad, existiendo por lo tanto una fuerte correlación entre éstas condiciones y el estrato socioeconómico de la población. Afecta aproximadamente del 10% al 20% de la población mundial, siendo catalogada como la tercera causa de muerte en el mundo; lo cual constituye un problema frecuente y prioritario de salud por el impacto socioeconómico que ésta tiene. En México constituye un problema muy importante de salud publica por su frecuencia y mortalidad.

Entamoeba histolytica fue descubierta hace aproximadamente 100 años y desde entonces su incidencia ha aumentado como una constante hasta alcanzar cifras como las antes mencionadas. La amibiasis se transmite a través del quiste por la vía ano-mano-boca o vía fecal-oral.(Barreda-Abascal R. 1999)

El comité de expertos en amibiasis de la Organización Mundial de la Salud en el año de 1969 definió a la amibiasis como la condición de albergar al parásito *Entamoeba histolytica* con o sin manifestaciones clínicas (Padilla-Raygoza, N. 1999).

En forma experimental se ha producido amibiasis, principalmente hepática, a diversos mamíferos como gatos, perros, ratas, caballos y hamsters, siendo el hombre el principal reservorio. Como portador sano o convaleciente, es la principal fuente de excreción de quistes que es la fuente de infección. Al ser ingeridos los quistes entran en contacto con el tracto digestivo que en el momento de ubicarse en la zona del colon la pared quística se desintegra emergiendo el trofozoíto multinuclear el cual originará por división cuatro amibas a partir de un solo núcleo, que en forma trofozoítica invaden la mucosa del colon o bien se alojan en forma de comensales. Algunos de estos trofozoítos nuevamente se enquistan excretándose con las heces fecales, dando así inicio a otro ciclo de infección. Se puede ser portador con una variación de pocos meses hasta de 2 años, dejando este estado de forma espontánea. Los factores que influyen para el desarrollo de la enfermedad son: Factores por parte del parásito (La patogenicidad de las amibas, su virulencia, la cantidad de estas y la identificación de cepas patógenas o no patógenas). Factores por parte del huésped (La predisposición, el estado nutricional, edad, sexo, condición inmunológica y los hábitos higiénicos dietéticos). Factores del medio ambiente (Manejo de aguas y disposición inadecuada de excretas).

CICLO DE VIDA DE *ENTAMOEBA*

Quistes y trofozoítos: *Entamoeba histolytica* cuyo significado es " amiba destructora de tejido" presenta dos fases principales en su ciclo de vida (fig 1). El quiste: Es una célula esférica de 10 a 15 μm de diámetro, con cuatro núcleos y una gruesa pared probablemente de quitina, que lo protege de los cambios ambientales. No se adhiere al epitelio intestinal por lo que se expulsa junto con las heces fecales. Debido principalmente a su cubierta protectora puede vivir en el medio ambiente, en ocasiones por meses, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad en que se encuentre. Es resistente a las altas concentraciones de cloro, pero puede ser eliminado por filtración y destruirse por ebullición, yodo a 200 ppm y con ácido acético preparado a 5-10% (Orozco-Orozco, M.A.1999). Cuando los quistes han salido junto con las heces fecales contaminan las manos, el agua , las verduras, las frutas y alimentos en general, hasta encontrar otro huésped al cual infectan, por lo que es importante eliminar los quistes tanto del agua y de los alimentos contaminados así como del intestino de los portadores y diseminadores de la enfermedad. El quiste es la forma infectiva de la *Entamoeba histolytica.* Una vez que el quiste se ingiere, la pared de quitina se reblandece en el intestino delgado, la célula deja la pared, y rapidamente produce ocho trofozoítos uninucleados. Son altamente móviles y pleomórficos, miden entre 10 y 40 μm y son muy fagocíticos, se alimentan de bacterias, glóbulos rojos y células epiteliales. Tienen una gran cantidad de enzimas que digieren la matriz extracelular y ayudan a abrir el camino durante la invasión del epitelio intestinal por parte del parásito. Poseen las enzimas que participan directamente en la invasión del tejido y la destrucción de las células del huésped, lo que llama más la atención es una pequeña proteína llamada amebaporo la cual se inserta en la membrana de la célula blanco y le produce perforaciones (Lynch y col, 1982). El trofozoíto está más estudiado que el quiste dado la imposibilidad hasta ahora de enquistar a *Entamoeba histolytica*, el reto fundamental es bloquear su acción patógena contra las células blanco. La figura 2 muestra la aposición taxonómica de *Entamoeba histolytica* de acuerdo a la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica.

FORMAS CLÍNICAS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la infección amibiana como la presencia de *Entamoeba histolytica* en el organismo, cause o no manifestaciones clínicas (Padilla-Raygoza, N. 1999). La amibiasis puede manifestarse de la siguiente manera:

ASINTOMÁTICA.- Es cuando el individuo que presenta quistes de *E. histolytica* pero no manifiesta datos clínicos. El hallazgo de quistes del protozoario puede ser fortuito y el estado del portador puede durar hasta dos años; su importancia radica en que es una fuente de diseminación de la infección, sobre todo si se manejan alimentos y/o no se guardan normas de higiene adecuadas.

INTESTINAL AGUDA NO DISENTÉRICA.- Es un síndrome diarréico con emisión de heces blandas pero sin moco ni sangre, se puede acompañar de pujo, tenesmo, dolor moderado y no hay fiebre ni manifestaciones sistémicas. Es más frecuente en niños.

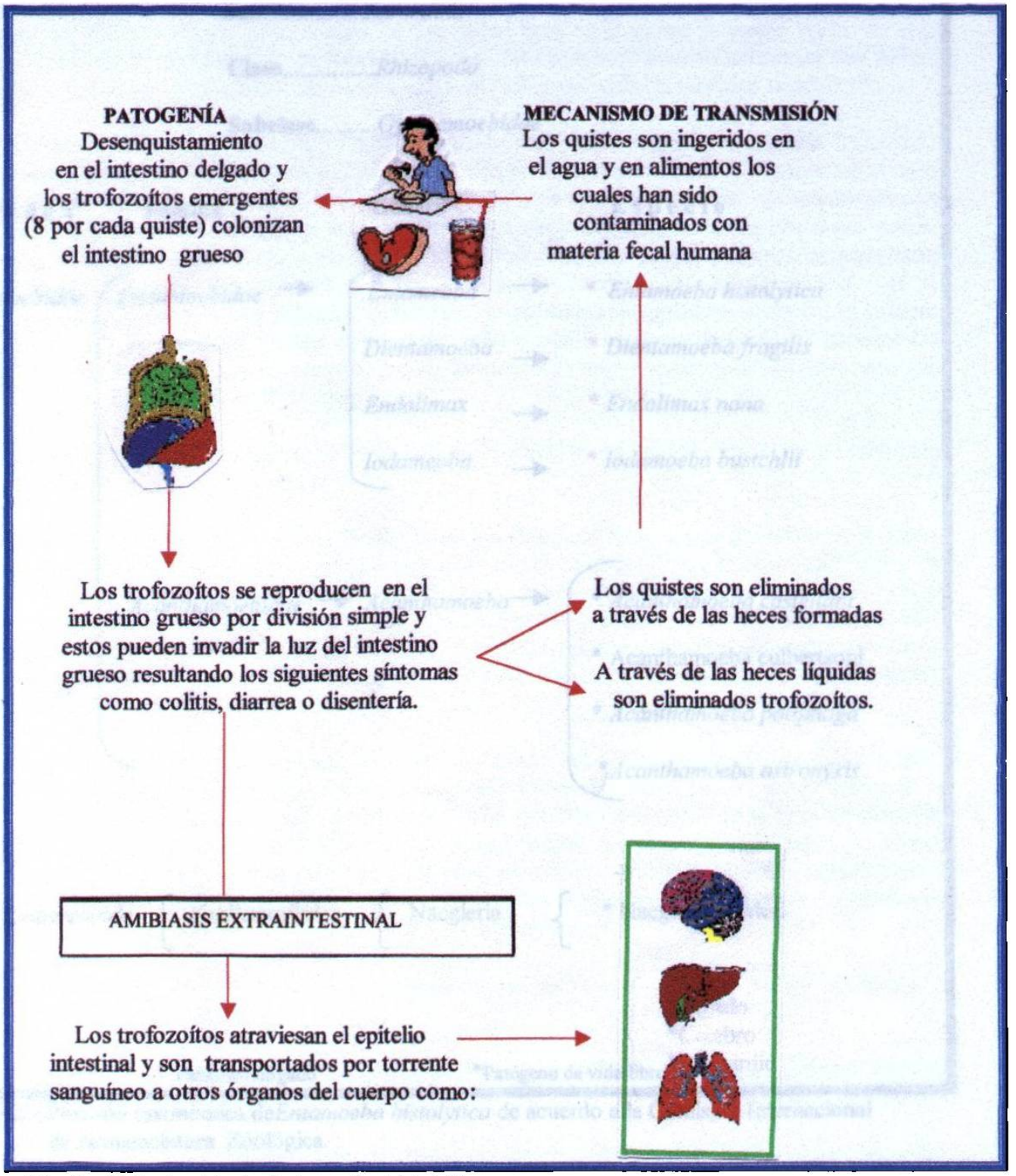

Fig. 1.- Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*

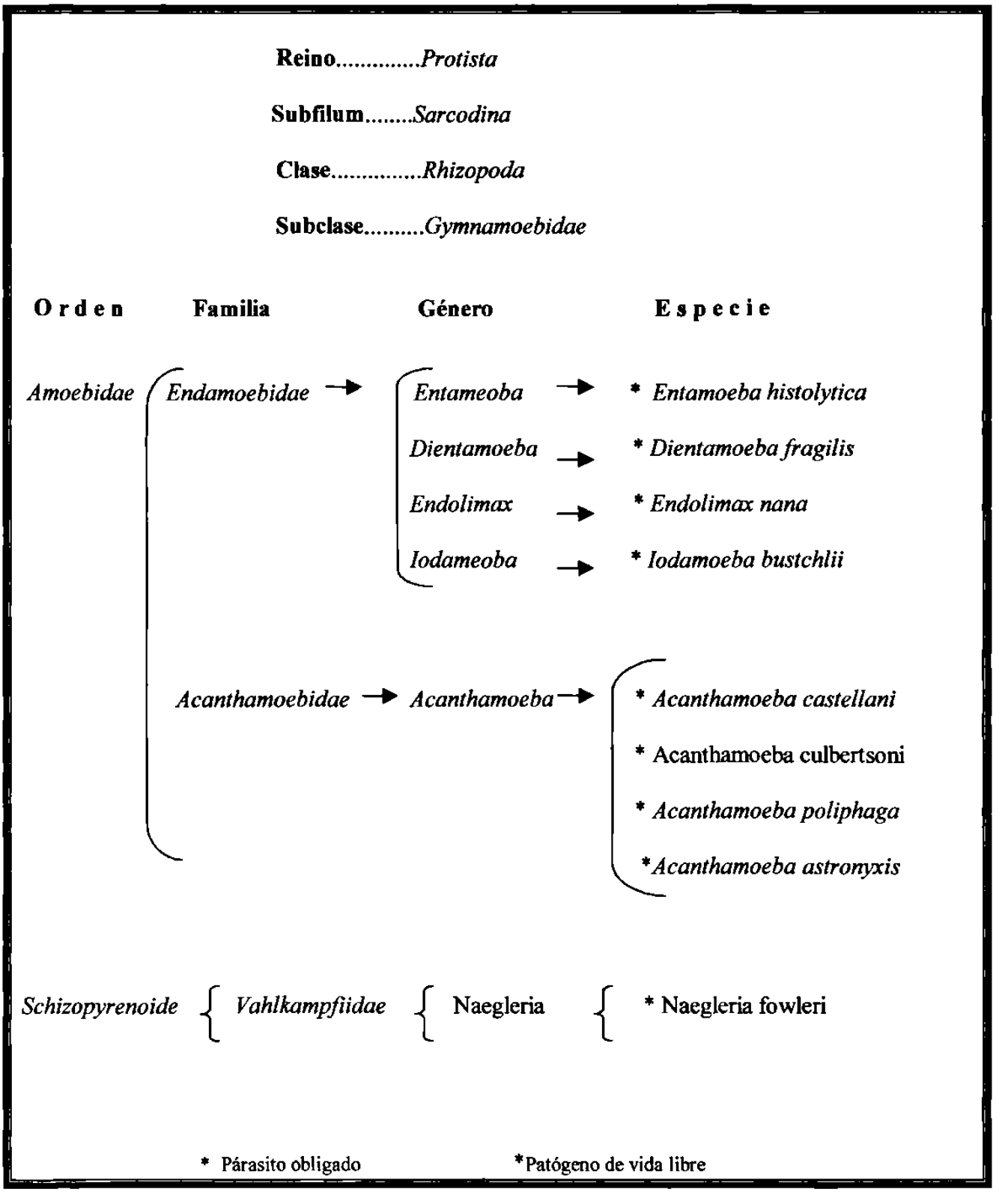

Fig.2.- Posición taxonómica de*Entamoeba histolytica* de acuerdo a la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica.

DISENTERÍA.- Es la forma más común ya que representa el 90% de la amibiasis invasora y generalmente dura menos de una semana. Se presenta con 3 a 5 evacuaciones sanguinolentas, con dolor cólico moderado que precede a la evacuación, la cual está formada por materia fecal escasa, líquida, teñida con sangre, generalmente no hay fiebre pero en lactantes se puede presentar con fiebre y sin sangre microscópica en las evacuaciones. Los pacientes desnutridos cursan con fiebre, ataque al estado general de salud, prolapso rectal e infección agregada: la letalidad es del 0.5%.

COLITIS AMIBIANA FULMINANTE (MEGACOLON TÓXICO, COLON TÓXICO AMIBIANO).- Es un estado clínico grave con rápida evolución. Presenta úlceras necróticas afectando grandes áreas del colon, lesiona todas las capas de la pared colonica. Se manifiesta con más de 20 evacuaciones al día formadas por materia fecal y sangre, precedidas por dolor cólico intenso, el tenesmo es constante y el malestar abdominal se hace presente, pudiendo acompañarse de náuseas, anorexia, fiebre de 39 a 40°C, hipotensión arterial y estado de choque. A la exploración física, el cólico es palpable y doloroso, la peristalsis se encuentra ausente y al realizar el tacto rectal, se encuentra pérdida del tono del esfínter anal y acartonamiento de las paredes del recto y al sacar el dedo escurre pus y sangre; su frecuencia es mayor en niños desnutridos menores de 3 años y la letalidad es del 50 al 80%.

APENDICÍTIS.- Es indistinguible de otras causas de infección del apéndice cecal, se presenta con mayor frecuencia en adultos jóvenes.

ABSCESOS HEPÁTICOS.- Es más frecuente en adultos, pero es de mayor gravedad en infantes, predomina en niños de 5 años, se presenta con mayor frecuencia en el sexo masculino en proporción de 10 a 1 con relación al sexo femenino y predomina su localización en el lóbulo derecho, Inicia en forma súbita con dolor en hipocondrio derecho que se irradia a hombro derecho y/o región escapular, se acompaña de calofrios, diaforesis, anorexia, vómito, diarrea o disentería. A la exploración se encuentra hepatomegalia dolorosa. Puede haber ruptura a cavidad pleural, peritoneo, pericardio o diseminación a cerebro o piel.

AMIBIASIS CUTÁNEA.- Resulta del contacto directo del trofozoíto de *E. histolytica* y piel. Puede ser primaria como en las formas intestinales invasoras afectando la región perianal, o secundarias a partir de un absceso hepático amibiano que haya fistulizado la piel, la localización más frecuente es la región anogenital. Las úlceras tienen forma serpentiginosas con bordes cortados a pico y su base está sucio con material necrótico y secreción amarilla-sanguinolenta, pudiendo estar el borde cubierto con exudado; sangran fácilmente. Entre las complicaciones infecciosas, la neumonía y la septicemia son las más frecuentes.

PERFORACIÓN INTESTINAL.- Generalmente es secundaria a colon tóxico amibiano o perforación del apéndice cecal.

PERITONITIS.- Es secundaria a la perforación intestinal, ameboma, ruptura de absceso hepático a cavidad peritoneal.

CHOQUE SÉPTICO.- Aparece como consecuencia de la perforación intestinal y de la peritonitis. Se manifiesta con hipotermia, hipotensión arterial, alteraciones de la conciencia, piel marmórea, llenado capilar lento, es la complicación más grave.

INVAGINACIONES INTESTINALES.- Se presenta en lactantes que están precediendo disentería o colitis necrotizante. Se presenta en forma secundaria a la disentería.

Por lo anterior, se considera que el estudio acerca del enquistamiento de *E. histolytica* tiene especial interés, pues el entendimiento de los mecanismos biológicos implícitos en éste proceso favorecerá investigaciones futuras para prevenir la formación del quiste.

Estudios *in vivo, in vitro* y de microscopía han permitido concluir que *E. invadens, E. coli* y *E. histolytica* tienen algunas similitudes estructurales entre las paredes de los quistes obtenidos.

ANTECEDENTES

La primera descripción de las amibas, correspondió a los microorganismos que cambiaban de forma reportados por Rosel Van Rosenhof en 1755, a los que llamó "El pequeño proteo" y en 1839 se crea el género Amoeba; contra lo que más se ha difundido en relación al descubrimiento de *Entamoeba histolytica*, no fue Lösh quien la observó por primera vez y lo registró en alguna publicación, sino Lambl, quien en 1860 publicó la identificación microscópica de un microorganismo que encontró al estudiar las heces de un niño en Praga, quien padecía de la denominada diarrea infantil; sin embargo consideró que este protozoario no era patógeno y aparecía asociado a casos de patología intestinal. Lewis y Cunningham en 1870 y 1871 respectivamente, aislaron al microorganismo a partir de materia fecal de un paciente con diarrea con enfermedad colérica, pero consideraron que se trataba de un microorganismo inocuo. Se ha establecido como 1875 fecha en que se realiza el descubrimiento de *Entamoeba histolytica* por parte de Fredor Aleksandrovich Lösch, él publicó su trabajo denominado "Desarrollo masivo de amibiasis en el intestino grueso", en una revista médica de Berlín, editado por el Dr. Rudolf Virchow ésta enfermedad era adjudicada a *Entamoeba gingivalis*, la cual después fue designada con el nombre de *Entamoeba histolytica.* (Imperato P.1981)

Roberth Koch en 1887 encontró amibas en heces y colon de pacientes con disentería, además de identificarlas en conductos capilares hepáticos, ya que estos pacientes también padecían de abscesos hepáticos, por lo que la relacionó entre infección intestinal y hepática; en el mismo año Hlava en Checoslovaquia demuestra el poder patógeno de la amiba en forma experimental a partir de microorganismos obtenidos de pacientes con disentería y Kartulis demuestra la etiología amibiana en 20 casos de absceso hepático. Romero-Caballero R., (1994) menciona que Councilman y Lafler (1891) crearon el término de "Disenteria amibiana", Quinck y Ross (1839) descubrieron las formas quísticas y Schaudin (1903) la bautizó definitivamente como *E. histolytica*, confirmándose por Walker y Sellard (1913) que éste protozoario era el causante de la colitis amibiana.

E. histolytica fue cultivada por primera vez en 1918 por Culter en una infusión de huevo o de sangre y solución salina o albumina de huevo fresco en presencia de flora entérica humana de composición desconocida (Boeck y Drbohlav en 1925).

El primer cultivo monoxénico de *E. histolytica* fue obtenido por Cleaveland y Sanders (1930), ellos encontraron que cultivos xénicos en agar con infusión de hígado cubiertos o con suero salino y harina de arroz formaban un medio en el que *E. histolytica* podía completar todo su ciclo de vida. Tan pronto como los quistes maduraban estos desenquistaban, llegando a existir simultáneamente en el cultivo división mitótica de trofozoítos, enquistamiento y desenquistamiento. Finalmente concluyeron que al menos son necesarias tres cosas para que el enquistamiento tenga lugar: 1) crecimiento rápido y multinucleación de las amibas por 24 h o más sin subcultivarlas hasta que llegan a ser abundantes, 2) la presencia de harina de arroz, almidón de arroz o polvo de arroz en el medio para alimentar a las amibas y 3) la presencia de por lo menos 6 diferentes especies de bacterias en el medio.

Balamut (1946), describió los primeros medios líquidos en los cuales, para que las amibas crezcan y se multipliquen es necesario la asociación con otros comensales y adición de almidón de arroz. Inicialmente sólo se utilizó infusión de yema de huevo pero al adicionar extracto de hígado, se encontró un incremento en el crecimiento celular. Nelson (1947) desarrolló un método de preparación de un medio favorable para *E. histolytica* de extractos alcohólicos, de varios tejidos frescos y también de yema de huevo, encontrando que éste medio resultaba ser muy bueno para aislar a este parásito y para el mantenimiento de la cepa. Chin et al. (1942), (citado por Balamuth, 1951) señala que una mezcla de bacterias que incluían a *Clostridium perfringens, Escherichia coli comunior, Escherichia coli anaerogenes,* estimulaban el crecimiento y enquistamiento de *E. histolytica;* resientes investigaciones señalan que las bacterias disminuyen el potencial de oxidorreducción a nivel de colon (Lazos-Ochoa M. 1994).

Rees y col (1941) Asociaron a las amibas con un bacilo gramnegativo microaerofílico denominado "organismo t". Más tarde Jacobs (1947) introdujo el uso de un antibiótico, la penicilina, para inhibir y eventualmente eliminar una bacteria sensible, *Clostridium perfringens*, de un cultivo monoxénico amiba-bacteria

El primer cultivo axénico de una especie de *Entamoeba* al parecer fue obtenida por Stoll y col.(1957), quien obtuvo crecimiento de *E. invadens* en un medio que estuvo libre de cualquier otro tipo de células. Stoll inicia estos cultivos con *E. invadens* que fue crecida en una muestra de suero-salino conteniendo un pedazo de hígado fresco estéril. Stoll mantuvo a la cepa en este medio libre de células por aproximadamente cinco años por transferencia de la amiba a tubos con medio fresco.

Un medio simple para crecimiento axénico de *E. invadens* fue desarrollado por Mc Connachie (1962). En él un digerido de hígado de res seco es utilizado en lugar de suero y así el medio puede ser autoclaveado. Diamond (1961) tuvo éxito al conseguir crecimiento de *E. histolytica* axenicamente en un medio difásico suplementado con extracto de embrión de pollo. Nuevamente Diamond (1968), diseñó un nuevo medio monofásico al cual llamó TPS-1, este medio estaba compuesto por tripticasa de caseína, Panmede (un extracto de hígado) y complementado con suero de caballo. Éste medio permitió por primera vez el cultivo masivo de *E. histolytica*, para la obtención de antígenos empleados con fines diagnósticos, para pruebas serológicas, bioquímicas y estudios encaminados al desarrollo de medicamentos antiamibianos.

El Panmede producía rendimientos muy variables, pero más tarde, Diamond (1978) creó el medio TYI-S-33, un medio más efectivo que el TP-S-1, debido a que producía rendimientos más

altos y menos variables, el Panmede se sustituyó por extracto de levaduras, suplemento de hierro, vitamina B_{12}, ácido tióctico y tween 80.

En el medio TYI-S-33 se observó que la calidad de los cultivos de *E. histolytica* depende de los lotes de extractos de levaduras por lo que Said-Fernández y col (1988) crean el medio PEHPS, el cual presenta ventajas en la reproducibilidad en sus rendimientos, pueden desarrollarse cultivos a partir de inóculos tan bajos como un trofozoíto/mL, se pueden almacenar durante 9 meses a temperatura ambiente. En este medio se inicia aparentemente el proceso de formación de pared.

Diamond y Cunnick en 1991 (citado por Mata-Cárdenas y col.,1997) desarrollaron un medio de cultivo parcialmente definido llamado PDM-805 el cual no contenía suero y estaba constituido principalmente por aminoácidos, carbohidratos, vitamina B, precursores de ácidos nucléicos, un factor de crecimiento aislado de la tripticasa, seroalbumina bovina y una solución de lipoproteína-colesterol. En este medio se veía disminuída la actividad tóxica de la amiba al parecer se debía a la presencia de seroalbúmina.

Recientemente Mata-Cardenas y col. (1996) describieron una solución que reemplaza al suero en un cultivo axénico de protozoarios, el cual es denominado PACSR (Protozoa Axenic Cultivation Serum Replacement) el cual combinado con PEHP o TYI produce muy buenos resultados en el cultivo de *E. histolytica* en ausencia de suero.

Las principales justificantes encontradas en investigaciones recientes para sustituir al suero de los medios de cultivo para amibas, son las siguientes: a) Composición indefinida, b) puede estar contaminado por virus, c) la calidad de los lotes es variable, d) inhibe algunas actividades biológicas, incluyendo citolisinas y proteasas (Freshney, 1987) y e) entorpece la detección y aislamiento de proteínas recombinantes, f) inhibe la actividad colagenolítica de *E. histolytica* (Muñóz y col, 1982) y algunos factores de virulencia (Bos, 1979) g) La albúmina sérica impide la unión de las adhesinas amibianas a las células blanco (Kobiler y col, 1981) y algunas proteasas son inhibidas por las macroglobulinas sérica alfa-1 y alfa-2 (Lushbaugh y col, 1981).

ENQUISTAMIENTO AXÉNICO DE *Entamoeba histolytica*

A partir de 1968, año en que Diamond describió el medio TP-S-1 para el cultivo axénico de trofozoítos de *E. histolytica*, se ha avanzado en el conocimiento de la Biología Celular y Molecular de los trofozoítos, pero no así para los quistes y su proceso de formación.

Se han reportado algunos trabajos donde se indica que *E.* histolytica puede ser enquistada axenicamente *in vitro* o formar estructuras con pared sin llegar a formar verdaderos quistes. Campos-Gongora (1996) menciona que el medio PEHPS enriquecido con los iones Mn^{+2}, Mg^{+2} y Co^{+2}, favorece la síntesis de quítina. Otro medio que favorece la formación de altos porcentajes de quistes (60-74%) es el medio de Boeck y Drobhlav adicionado con glucosa e histamina, según Nayeen M. A. (1993).

Ante la dificultad de obtener quistes de *E. histolytica* en cultivos axénicos, la mayoría de los investigadores han usado a *E. invadens* para el estudio del proceso de enquistamiento. Sin embargo, dentro de la familia *Amoebidae E. invadens* y *E. histolytica* son grupos filogenéticamente distintos (Fig. 3)como lo demuestran estudios basados en la secuencia de genes del RNA(Silberman, J.D, 1999), por lo tanto los datos obtenidos al respecto no son totalmente extrapolables a *E. histolytica* como lo señaló López-Romero y col. (1993).

En experimentos preliminares realizados en nuestro Laboratorio, hemos desarrollado un procedimiento, basado en alta tensión de CO_2 en el medio de cultivo (Morales-Vallarta y Villarreal-Treviño, 1997), en el cual se forma una estructura semejante a quistes en *E. histolytica.* Estas formas semejantes a quistes presentan cuerpos cromatoides, son uninucleados y son resistentes a sarkosyl 1% con un redimiento del 16%. Otras de nuestras observaciones indican que, la sustitución del suero por una mezcla formada de lípidos y aminoácidos denominada PACSR, (Mata-Cárdenas y col. 1996) produce una alta producción de quistes de *E. invadens.* (Barrón-González P. 1997)

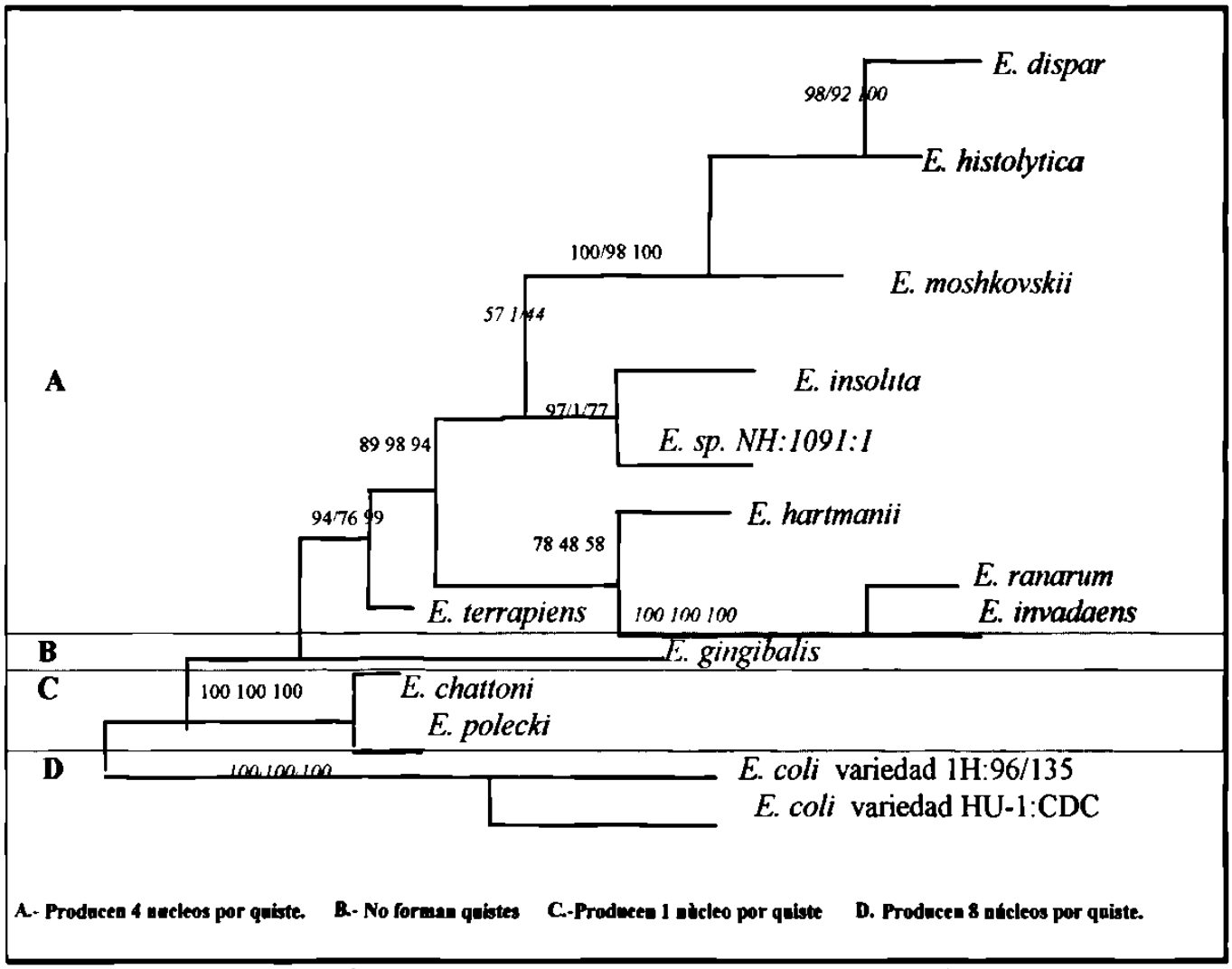

Fig. 3.- Posición filogenética de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba invadens.*

COMPOSICIÓN, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PARED QUÍSTICA

La composición química de la pared de quistes de las amibas del género *Entamoeba* no se ha esclarecido totalmente, Mc Conachie (1969) reportó que la pared quística de *E. invadens* está formada por un complejo de proteínas-carbohidratos. Más tarde, Arroyo-Begovich y col. (1980) demostraron que el componente mayoritario de la pared de quistes de *E. invadens* es la quitina la cual es un polímero de N-acetilglucosamina con enlace ß (1-4). Said-Fernández y col (1996), desarrollaron un medio en el cual se forman estructuras con un pared resistente al sarkosyl al 0.1% y encontraron que la pared es parecida a la de otros protozoarios como *E. invadens, Acanthamoeba castellanii* y *Giardia lamblia,* la cual está formada principalmente por quitina. La función de la pared quística es la de proteger a la célula en criptobiosis de condiciones de hipoosmolaridad y de otros factores desfavorables, como el efecto de sustancias tóxicas según Neff (1964) y Arroyo-Begovich y col. (1980).

Las características estructurales generales de la pared quística de protozoarios patógenos de los géneros *Entamoeba*, *Naegleria*, Acanthamoeba y *Giardia* son los siguientes: a) Están formados por una o dos capas, una de ellas formada principalmente de polisácaridos, b) Los polisacáridos sirven como matriz y dan rigidez y resistencia a la pared, c) Sobre la matriz de polisacáridos se originan diversos lipopolisacáridos y glicoproteínas y d) Los polisacáridos normalmente se encuentran formando capas superpuestas. Las paredes de los quistes de *E. invadens* formados en condiciones axénicas resisten el efecto del duodecilsulfato de sodio (SDS) al 1% según Arroyo-Begovich y Carabez-Trejo (1980).

SÍNTESIS DE LA QUÍTINA EN PARED CELULAR DE QUISTES DE AMIBAS

La pared celular de quistes de amibas, hongos y cubierta (exoesqueleto) de algunos animales pluricelulares, está formada principalmente de quitina, un homopolímero de la N-acetil-D-glucosamina (Glc-Nac) unidos por enlaces ß(1-4), (Fig. 4). Para su síntesis es necesaria la presencia de iones catiónicos divalentes Mg^{+2}, Mn^{+2} y Co^{+2} como cofactores, ésta reacción es catalizada por la enzima quitina-sintasa, también conocida como UDP-2 acetamido-2-deoxi-D-glucosaquitina 4-beta-acetamidodeoxiglucosil transferasa. (Horst M.N, 1981).

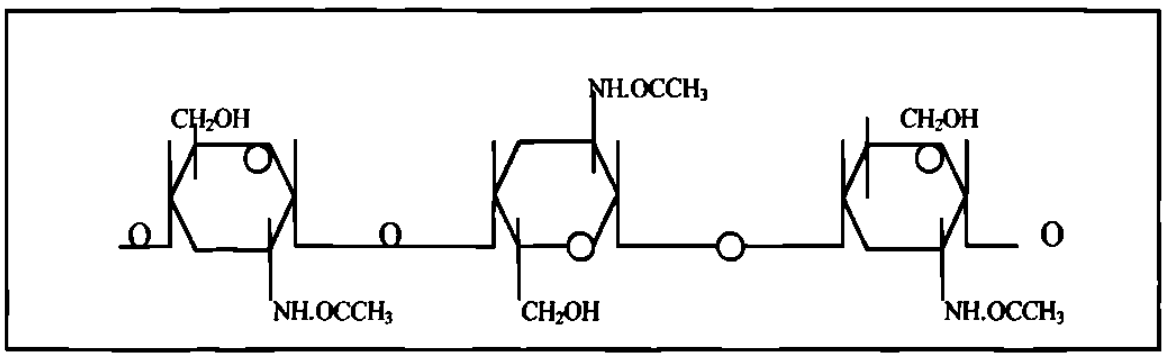

Fig 4.- Estructura química de la quitina

Das, S y Guillin, F.D. (1992), demostraron la presencia de dos formas de quitina sintasa en *Entamoeba invadens*: Una forma soluble y una forma particulada y se sugirió que esta enzima podría ser esencial para la formación de la pared quística de *E. invadens*. El 60% de la actividad enzimática de la quítina-sintasa se encuentra en forma soluble, su mayor actividad la presenta a un pH de 6.0; el 40% restante de la actividad enzimática se encuentra en forma particulada y su mayor actividad es a un pH entre 7.0 y 7.5, la actividad de ambas fracciones depende de la presencia de Mg^{+2}, Mn^{+2} y Co^{+2}. Por otra parte Chang (1946) señala que el pH de 6.8 a 7.1 es ideal para el enquistamiento de *E. histolytica.*

El principal obstáculo para estudiar adecuadamente los quistes y el enquistamiento de *E.histolytica* consiste en la falta de un medio o un método que permita la producción de quistes de *E. histolytica* en cantidades suficientes y en condiciones axénicas.

Debido a la dificultad para obtener quistes de *E. histolytica* en cultivos axénicos, la mayoría de los investigadores emplean como modelo biológico de enquistamiento a *E. invadens* y como ya se ha mencionado, los datos obtenidos al respecto no son totalmente extrapolables a *E. histolytica.*

Actualmente se cuenta con varios medios especiales para el crecimiento de trofozoitos de *E.histolytica*, pero no se ha desarrollado a la fecha un medio que permita su enquistamiento masivo.

Por otra parte se ha desarrollado un método de enquistamiento para *Entamoeba invadens*. (Morales-Vallarta y Villarreal-Treviño, 1997) Este método de enquistamiento para *E. invadens* cuando se aplica a *E. histolytica* produce formas semejantes a quistes con paredes imperfectas, sin embargo su estructura interna tiene algunas características semejante a un quiste. En el método de enquistamiento se involucran factores tales como alta tensión de CO_2, suero estéril de bóvino y ayuno de glucosa, pero hay otras sustancias que son sugestivas de inducir el enquistamiento en combinación con variantes, ya sea de la concentración de CO_2, suero, concentración de iones activadores de la quitin sintetasa, o de otros factores, como la sustitución del suero por una mezcla de lípidos y aminoácidos (PACSR)

El hecho de que pueda ser inducida la formación de estructuras semejantes a quistes modificando y combinando algunos factores del medio en un cultivo axénico, indica que es posible encontrar condiciones de cultivo que puedan inducir el enquistamiento de *E. histolytica* en forma axénica, como sucede con *E. invadens.*

HIPÓTESIS

Es posible encontrar condiciones axénicas adecuadas para inducir *in vitro* quistes o formas semejantes a quistes en *Entamoeba histolytica.*

OBJETIVO GENERAL

Encontrar un medio o método de enquistamiento axénico *in vitro* que permita obtener altos rendimientos de quistes o estructuras semejantes a quistes de *Entamoeba histolytica.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Establecer y comparar el patrón de crecimiento de *E. histolytica.* con tensión normal y alta tensión de CO_2

2) Analizar el efecto de la histamina adicionada a los medios TYI y PEHP sobre la calidad y cantidad de las estructuras semejantes a quistes en base a la resistencia que presentan al detergente sarkosil.

3) Determinar el efecto del tioglicolato sobre la calidad y cantidad de estructuras semejantes a quistes.

4) Diseñar un método de enquistamiento o inductor de formas semejantes a quistes para *E. histolytica* en base a la combinación de diferentes factores que han sido reportados como inductores de formas con características de quistes en *E. histolytica* y factores que inducen el enquistamiento en *E. invadens.*

5) Determinar el efecto del suero esterilizado por radiación (2.5 Mrads) adicionado a los medios TYI, PEHP y PET sobre la calidad y cantidad de quistes o de estructuras semejantes a quiste obtenidos.

6) Determinar el efecto del suero esterilizado por filtración, adicionado a los medios TYI, PEHP y al PET sobre la calidad y cantidad de quistes o de estructuras semejantes a quistes.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1.- MATERIAL BIOLÓGICO

a) Cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica.*

b) Enterobacterias *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis.*

c) Suero de bovino esterilizado por irradiación. El suero bovino se obtuvo de sangre colectada en el Rastro de Monterrey, ésta se dejó coagular y se separó por sedimentación a 2,000 rpm durante 15 min. Después se filtró con papel Whatman No. 1 y se esterilizó a 2.5 megarads en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) y se almacenó en frascos ambar bajo refrigeración, hasta su empleo.

d) Suero de bovino esterilizado por filtración. El suero bovino se obtuvo de sangre colectada en el Rastro de Monterrey, ésta se dejó coagular y se separó por sedimentación a 2,000 rpm por 15 min. Después se filtró con papel Whatman No.1 y se esterilizó por filtración utilizando sistemas de filtración al vacío de un litro con filtro de 0.22 µm Corning, Inc. Corning NY, USA. El suero estéril se descomplementó por calentamiento a 56°C por 30 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 25 mL de mezcla vitamínica (JRH Bioscences, Lenexa, KS) por cada litro de suero. El suero se distribuyó en alícuotas de 100 mL y se almacenó en frascos ambar bajo refrigeración, hasta su empleo.

2.- REACTIVOS Y SOLUCIONES

SOLUCIÓN DE EARLE (EAGLE, 1959)

SOLUCIÓN 1 (DE SALES).

Solución 1a. Se pesaron 9.05 g de NaCl; 0.40 g de KCl; 0.14 g de Na_2HPO_4; y se disolvieron en 800 ml de agua. Se ajustó el pH a 7.2. Se colocó en botellas en porciones de 64 ml, se esterilizó por autoclave y se guardó a temperatura ambiente.

Solución 1b. Se pesaron 2.0 g de $CaCl_2$ y se disolvieron en 1 litro de agua. Se procedió a colocar la solución en alícuotas de 100 ml, se esterilizó por autoclave y se guardó a temperatura ambiente.

Solución 1c. Se pesaron 2.0 g de $MgSO_4.7H_2O$ y se disolvieron en 1 litro de agua, la solución se colocó en alícuotas de 100 ml y se esterilizó por autoclave y se guardó a temperatura ambiente.

Solución de trabajo de sales. Se preparó al tomar de la solución **1a**, 64 ml; de la solución **1b**, 8 ml y de la solución **1c**, 8ml. Se mezclaron inmediatamente antes de añadir el resto de los componentes.

SOLUCIONES DE AMINOÁCIDOS.

AMINOÁCIDOS ESENCIALES.

Solución 1(100 X). Se pesaron 1.27 g de L-arginina; 0.38 g de L-histidina. HCl; 0.58 g de L-lisina; 0.52 g de L-leucina; 0.52 g de L-isoleucina, 0.15 g de L-metionina; 0.32g de fenilalanina; 0.48 g de L-treonina; 0.10 g de L-triptófano; 0.46g de L-valina. Se disolvieron en un vaso de precipitado en 100 ml de la solución 1 (de sales) la cual se calentó a 80° C y se esterilizó por filtración y se distribuyó en alícuotas de 10 mL y enseguida se guardaron los tubos envueltos en papel aluminio a 4°C.

Solución 2(100 X). Se pesaron 0.36 g de L-tirosina; 0.24 g de L-cistina. Se disolvieron en 100.0 mL de HCl 0.1N, esta solución se calentó ligeramente, se esterilizó por filtración, se distribuyó en alícuotas de 10 mL y se almacenó a 4°C en tubos envueltos en papel aluminio.

Solución 3 (100 X). Se pesaron 2.29 g de L-glutamina, se disolvieron en 100 ml de solución 1, se esterilizó por filtración y se distribuyó la solución en alícuotas de 10 ml y se procedió a guardar los tubos envueltos en papel aluminio a 4°C.

Solución 4 ó de aminoácidos no esenciales. Se pesaron 0.089 g de L-alanina; 0.150 g de L-asparagina. H_20; 0.133 de L-ácido aspártico; 0.147 g de L-ácido glutámico; 0.115 g de L-prolina; 0.105 g de L-serina; 0.075 g de Glicina. Se disolvieron en 100 ml de agua bidestilada y se procedio a esterilizar por filtración, se repartió la solución en alícuotas de 10 ml y se guardaron los tubos envueltos en papel aluminio a 4°C.

SOLUCION DE VITAMINAS

Se preparó empleando la mezcla vitamínica 107 (Diamond, 1968) y la mezcla vitamínica-Tween 80 (Diamond y col, 1978).

MEZCLA VITAMÍNICA 107

1) **Solución de vitaminas B hidrosolubles.**

Solución a.- Se disolvieron en agua bidestilada hirviendo, 62.5 mg de niacina y 125 mg de ácido p-aminobenzoico. Se aforó a 150 ml.

Solución b.- Se disolvieron en agua bidestilada, 62.5 mg de niacinamida; 125 mg de Inositol 62.5 de hidrocloruro de piridoxina; 62.5 mg de hidrocloruro de piridoxal; 25 mg de hidrocloruro de tiamina; 25 mg de pantotenato de calcio; y 1,250 mg de cloruro de colina y se aforó a 150 mL.

Solución c.- Se disolvieron 25 mg de riboflavina en 75 mL de agua bidestilada con la ayuda de NaOH 0.1 N agregándolo gota a gota y se aforó a 100 mL.

Solución de vitaminas B hidrosolubles.- Se mezclaron las soluciones a,b y c. Se aforó a 500 mL con agua bidestilada

2) **Solución de biotina.** Se disolvieron 30 mg de D-biotina en 200 mL de agua bidestilada con la ayuda de NaOH 0.1 N y se aforó a 300 mL.

3) **Solución de ácido fólico.** Se disolvieron 30 mg de ácido fólico en 200 mL de agua bidestilada con la ayuda de NaOH 0.1N y se aforó a 300 mL.

4) **Solución de vitaminas liposolubles (A,D y K).**
Solución a.- Se disolvieron 300 mg de vitamina D2 (calciferol) en 63 ml de alcohol etílico al 95% (v/v). En ésta solución se disolvieron 300 mg de vitamina A.

Solución b.- Se disolvieron 60 mg de vitamina K (menadiona bisulfito de sodio) en 300 mL de una solución acuosa de Tween 80 al 5% (v/v). La solución b se mezcló con la solución a y el volumen se aforó a 3,000 mL con agua bidestilada.

5) **Solución de vitamina E.**
Se disolvieron 25 mg de vitamina E (acetato de alfa tocoferol) en 250 mL de agua bidestilada

MEZCLA DE TRABAJO DE LA MEZCLA VITAMÍNICA 107.- Se mezclaron las soluciones estándar en las siguientes proporciones: 500 mL de la solución de vitaminas B hidrosoluble, 250 mL de la solución de biotina; 250 mL de la solución de ácido fólico; 2,500 ml de la solución de las vitaminas liposolubles y 250 mL de la solucióin de vitamina E. La mezcla completa se esterilizó por filtración y se almacenó en la obscuridad a –20°C.

MEZCLA VITAMÍNICA-TWEEN 80

Solución a.- Mezcla vitamínica 107.

Solución b.- Se disolvieron 40 mg de vitamina B 12 en 40 ml de agua bidestilada y se aforó a 100 mL con agua bidestilada.

Solución c.- Se disolvieron 100 mg de DL-6, 8 ácido tioctico en 100 mL de alcohol etílico absoluto.

Solución d.- Se disolvieron 50 mg de tween 80 en 100 mL de alcohol etílico absoluto.

MEZCLA DE TRABAJO DE LA MEZCLA DE VITAMINAS-TWEEN 80.- Se mezclaron 1,000 ml de la solución a; 12 mL de la solución b; 4 mL de la solución c; 4 mL de la solución d y 180 mL de agua bidestilada. Se esterilizó por filtración y se almacenó a –20°C en la obscuridad.

SOLUCION DE TRABAJO DE EAGLE PARA SUSTITUTO DE SUERO. (Mezcla de aminoácidos). Se añadió a cada botella de la solución 1 (80 mL), 2.5 mL de las soluciones 1,2,3 y 4 de aminoácidos y 2.5 mL de la solución de vitaminas.

LCR (Lipid Cholesterol Rich). De acuerdo con Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA, este producto contiene lípidos (fosfolípidos 11.3 mg/mL, ácidos grasos libres 12.5 mg/mL y lipoproteínas 23 mg/mL), Colesterol (11.4 mg/mL preparado a partir de suero bovino adulto).

PACSR (Protein Axenic Culture Serum Researche). A un tubo con tapón de rosca conteniendo 9 mL de la solución de trabajo de Eagle se le adicionó 1 mL de lípidos (LCR). Esta mezcla se empleó como sustituto del suero bovino.

No se utilizó medio de cultivo con más de dos semanas después de su preparación. Antes de ser inoculados, los medios se completaron con 1 mL de solución PACSR y 0.1 mL de la solución de trabajo de penicilina-estreptomicina (1000 X).

A) SOLUCIÓN DE PENICILINA-ESTREPTOMICINA.

1) SOLUCIÓN CONCENTRADA DE PENICILINA: A un frasco ámpula de 1,000,000 de U de Penicilina-G sódica cristalina, se le inyectaron con aguja y jeringa estéril 5.0 mL de agua bidestilada estéril para disolver la penicilina.

2) SOLUCIÓN PATRÓN DE PENICILINA-ESTREPTOMICINA: A un frasco ámpula de sulfato de estreptomicina, se le añadió bajo condiciones de esterilidad, la solución concentrada de penicilina y se mezclaron.

3) SOLUCIÓN DE TRABAJO DE PENICILINA-ESTREPTOMICINA(1000 X): Se transfirió asépticamente toda la solución patrón de penicilina-estreptomicina del frasco ámpula en una probeta estéril de 25 mL y se aforó a 20 mL con agua bidestilada estéril. Se almacenó a –20°C en alícuotas de 5 mL en tubos de 13 x 100 mm. cubiertos con papel aluminio.

B) HIDÓXIDO DE SODIO 10 N: Se disolvieron 40 g de NaOH en 100 mL. de agua destilada.

C) HCl 0.1 N: Se aforaron hasta 50 mL con agua destilada 0.41 mL. de HCl concentrado (12 N)

D) HISTAMINA 0.6 mM: Se disolvieron 0.05 mg. de Histamina en 25 ml de agua destilada.

E) CALCOFLÚOR 1.0%.- Se pesaron 0.1 g de calcoflúor y se aforó hasta 10 mL con agua destilada.

F) SARCOSYL 0.15% : Se disolvieron 0.15g de sarkosyl en agua destilada y se aforó hasta 100 mL.

G) TIOGLICOLATO 0.087mM.- Se disolvieron 0.25g de tioglicolato en 20 ml de agua destilada.

3.- MEDIOS TYI, PEHP y PET.

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

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN g/500 ml de agua bidestilada desionizada
Peptona de caseína	10.00
Extracto de levadura	5.00
NaCl	1.00
L-cisteína	0.50
Acido ascórbico	0.10
K_2HPO_4	0.50
KH_2PO_4	0.30
Citrato férrico de amonio	0.00114
D-glucosa anhidra	5.00

Se mezclaron todos los componentes y se disolvieron en 300 mL de agua bidestilada desionizada. Se ajustó a un pH de 7.0 con NaOH 10N y se aforó a 500 mL con agua bidestilada desionizada. Se distribuyó en alícuotas de 10 mL. en tubos de 13x100 mm con tapón de rosca, se esterilizó a 121°C/15 min y se almacenó a congelación hasta su empleo.

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

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN g/500 ml de agua bidestilada desionizada
Peptona de caseína	5.00
Extracto de hígado y páncreas	125.00
D-glucosa	3.00
L-cisteína	0.50
Acido ascórbico	0.10
K_2HPO_4	0.50
KH_2PO_4	0.30

Se mezclaron todos los componentes y se disolvieron en 300 mL de agua bidestilada desionizada Se ajustó a un pH de 7.0 con NaOH 10N y se aforó a 500 mL. se procedió a distribuir en alícuotas de 10 mL en tubos de borosilicato de 13 x 100 mm. con tapón de rosca. Se esterilizaron a 121°C/15 minutos en autoclave.

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

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN g/500 ml de agua bidestilda desionizada
Peptona de caseína	7.50
Extracto de levaduras	2.500
Extracto de hígado-páncreas	62.50 mL
NaCl	0.5
L-cisteína	0.50
Acido ascórbico	0.10
K_2HPO_4	0.50
KH_2PO_4	0.30
Citrato férrico de amonio	0.000570
D-glucosa anhidra	4.0

Se disolvieron todos los componentes (excepto el extracto de hígado-páncreas) en 300 mL de agua bidestilada desionizada, enseguida se agregó el extracto de hígado-páncreas y se disolvieron , se ajustó a un pH de 7.0, se aforó a 500 mL. con agua bidestilada desionizada, se procedió a su distribución en alícuotas de 10 mL. en tubos de borosilicato de 13 x 100 mL y se esterilizó a 121°C /15min.

MÉTODOS

A) MANTENIMIENTO DE LA CEPA:

La cepa de *Entamoeba histolytica* se mantuvo mediante cultivo de resiembras sucesivas de 20,000 cel/ml en medio TYI-S-33, PEHP, PETS (cuando se utilizó suero) o PETP (cuando se utilizó PACSR) agregándo a cada tubo 0.1 mL de la solución de penicilina-estreptomicin (1000 X).

B) RENDIMIENTO CELULAR Y CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE *E. histolytica,* CRECIDO EN DISTINTOS MEDIOS UTILIZANDO SUERO IRRADIADO, SUERO FILTRADO O PACSR.

Se enfrió el tubo fuente de inóculo a 0-4°C durante 20 minutos para despegar las células adheridas al tubo y se determinó el número de células por mililitro de medio. Se dispuso de una series de 12 tubos con 10 mL. de medio (conteniendo ya sea el medio TYI, el medio PEHP o el medio PET, cada uno con suero irradiado, suero filtrado o PACSR), adicionados con 0.1 mL. de solución de antibiótico y se inoculó cada tubo con 2 x 10^4 células por mL de medio, se incubaron a 37°C y se realizaron cuentas por duplicado cada 24 horas para determinar el incremento de células y el tiempo en el que se alcanzó el máximo rendimiento.

C) CINÉTICA COMPARATIVA DE CRECIMIENTO DE *E. histolytica* CON Y SIN CO_2 EN EL MEDIO PEHP ADICIONADO CON SUERO IRRADIADO.

Se dispuso de una serie de 8 tubos conteniendo 10 mL de medio PEHP, más 0.1 mL. de solución de antibiótico, y 1.0 mL de suero irradiado. Se inocularon con $2x10^4$ cel/mL. de medio, se gasearon 4 de éstos tubos con CO_2 durante dos minutos, se incubaron a 37°C y los otros 4 tubos se incubaron sin ser gaseados, se realizaron cuentas por duplicado cada 48 horas para determinar el comportamiento de las células; el paquete celular resultante se fijó con glutaraldehído y se procedió a realizar cortes finos de estas muestras.

D) INDUCCIÓN DE FORMAS SEMEJANTES A QUISTES DE *E. histolytica*, EMPLEANDO EL MÉTODO DE ALTA TENSIÓN DE CO_2 (MÉTODO NORMAL)

Se utilizó el método de alta tensión de CO_2 (Morales Vallarta y Villarreal-Treviño,1997), el cual consta de dos fases: En una primera fase (de crecimiento) las células se inocularon en el medio de cultivo, se gasearon con CO_2 y se incubaron a 37°C por 3 a 4 días. En la fase de enquistamiento las células se lavaron en medio sin glucosa y se colocaron en el mismo medio también sin glucosa, se gasearon durante 2 min con CO_2 y se incubaron a 37°C por 3 a 4 días (Fig. 5)

E) EFECTO DE LA HISTAMINA, MEDIOS CONDICIONADOS DE ENTEROBACTERIAS Y CO_2 EN EL pH DEL MEDIO **PEHPS** Y EN EL MEDIO **PETS**.

Se dispuso de una serie de 3 tubos conteniendo 10 mL del medio PEHP, el cual se preparó a un pH de 7,8 y 9 respectivamente, se esterilizaron a 121°C/15 min, se dejaron temperar y se les midió el pH.

Se procedió a preparar 3 matraces con el medio PEHP a un pH de 7,8 y 9 respectivamente, a los cuales se les agregó los suplementos descritos en la Fig. 6 (Etapa de enquistamiento) y se procedió a medir el pH en cada matraz. (Este mismo procedimiento se efectuó empleando el medio PET).

F) INDUCCIÓN DE FORMAS SEMEJANTES A QUISTES DE *E. histolytica*, EMPLEANDO EL MÉTODO DE ALTA TENSIÓN DE CO_2 (MÉTODO MODIFICADO)

En la primera fase (de crecimiento) las células se inocularon en 8 tubos conteniendo el medio de cultivo, se gasearon con CO_2 y se incubaron a 37°C por 3 a 4 días. Enseguida se concentró el botón celular de los 8 tubos y se lavó este botón en el mismo medio pero sin glucosa. En la fase de enquistamiento (fase 2) la cual se realizó en matraz de 250 mL marca Pyrex, el botón celular se colocó en el mismo medio pero sin glucosa (30 ml), se gasearon durante 6 min con CO_2 , se agregó histamina 0.6 mM (1.8 mL), se añadió el sobrenadante del cultivo condicionado de las enterobacterias *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis* (15 mL de cada cultivo) previamente esterilizado en autoclave, se añadieron 3.0 mL de suero (esterilizado por filtración o por radiación) o PACSR y se incubaron a 37°C por 3 a 4 días (Fig. 6)

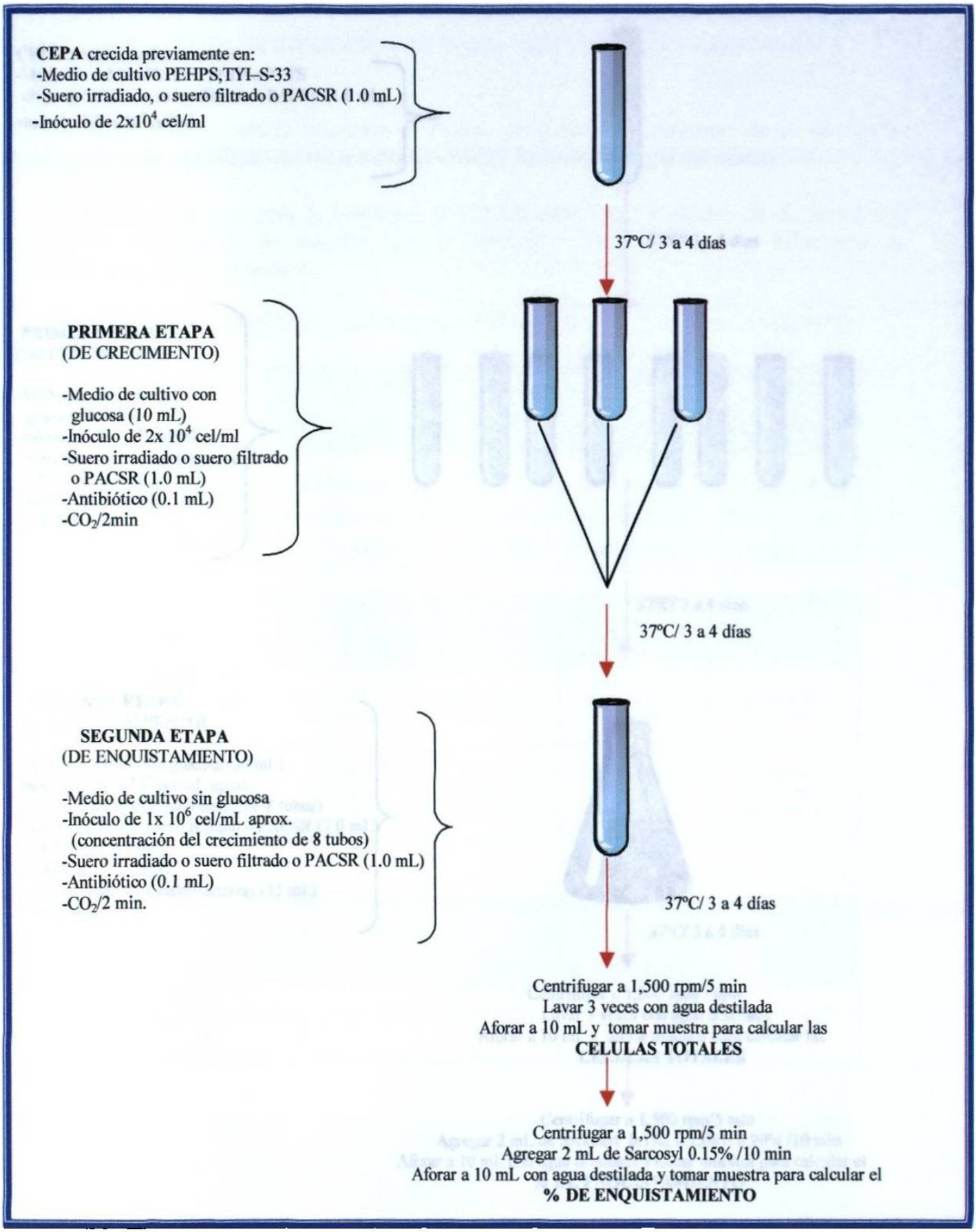

Fig.5.- Método con alta tensión de CO_2 para inducir la formación de estructuras semejantes a quistes de *Entamoeba histolytica*

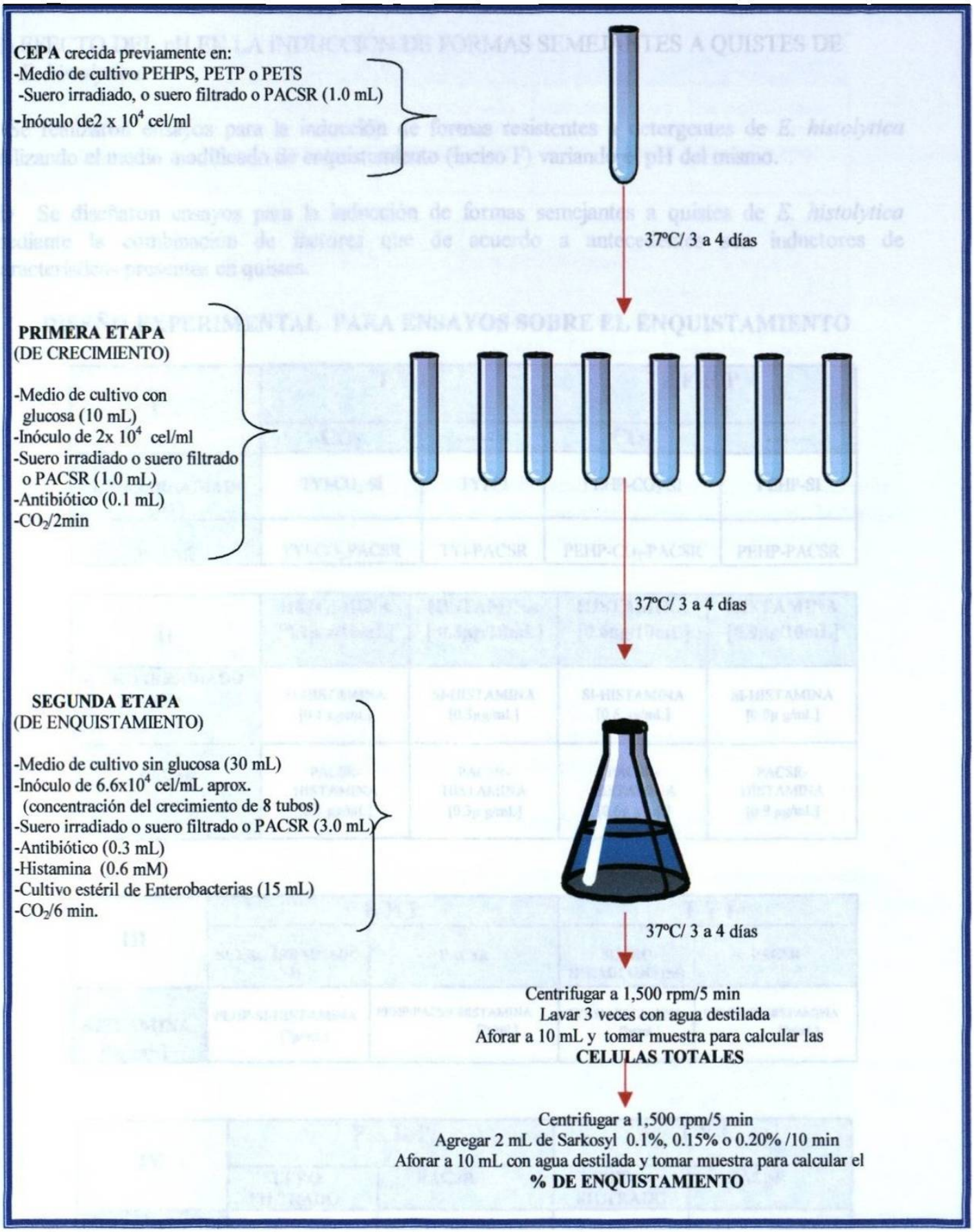

Fig 6.- Método con alta tensión de CO_2 (modificado) para inducir la formación de estructuras semejantes a quistes de *Entamoeba histolytica*

G) EFECTO DEL pH EN LA INDUCCIÓN DE FORMAS SEMEJANTES A QUISTES DE *E. histolytica.*

Se realizaron ensayos para la inducción de formas resistentes a detergentes de *E. histolytica* utilizando el medio modificado de enquistamiento (inciso F) variando el pH del mismo.

H) Se diseñaron ensayos para la inducción de formas semejantes a quistes de *E. histolytica* mediante la combinación de factores que de acuerdo a antecedentes son inductores de características presentes en quistes.

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ENSAYOS SOBRE EL ENQUISTAMIENTO

I	TYI		PEHP	
	CO_2	------	CO_2	----
SUERO IRRADIADO (SI)	TYI-CO_2-SI	TYI-SI	PEHP-CO_2-SI	PEHP-SI
PACSR	TYI-CO_2-PACSR	TYI-PACSR	PEHP-CO_2-PACSR	PEHP-PACSR

II	HISTAMINA [0.1µ g/10mL]	HISTAMINA [0.3µg/10mL]	HISTAMINA [0.6µg/10mL]	HISTAMINA [0.9µg/10mL]
SUERO IRRADIADO (SI)	SI-HISTAMINA [0.1 µg/mL]	SI-HISTAMINA [0.3µg/mL]	SI-HISTAMINA [0.6 µg/mL]	SI-HISTAMINA [0.9µ g/mL]
PACSR	PACSR-HISTAMINA [0.1 µg/mL]	PACSR-HISTAMINA [0.3µ g/mL]	PACSR-HISTAMINA [0.6µ g/mL]	PACSR-HISTAMINA [0.9 µg/mL]

III	PEHP		TYI	
	SUERO IRRADIADO (SI)	PACSR	SUERO IRRADIADO (SI)	PACSR
HISTAMINA [?g/mL]	PEHP-SI-HISTAMINA [?g/mL]	PEHP-PACSR-HISTAMINA [?g/mL]	TYI-SI-HISTAMINA [?g/mL]	TYI-PACS-HISTAMINA [?g/mL]

IV	PEHP		TYI	
	SUERO FILTRADO	PACSR	SUERO FILTRADO	PACSR
HISTAMINA [?g/mL]	PEHP-SF-HISTAMINA [?g/mL]	PEHP-PACSR-HISTAMINA [?g/mL]	TYI-SF-HISTAMINA [?g/mL]	TYI-PACSR-HISTAMINA [?g/mL]

V	PEHP		TYI	
	TIOGLICOLATO [40 Mm]	TIOGLICOLATO [60 Mm]	TIOGLICOLATO [80 Mm]	TIOGLICOLATO [90 Mm]
SUERO IRRADIADO	PEHP-SI-TIOG[40mM]	PEHP-SI-TIOG[60mM]	PEHP-SI-TIOG [80mM]	PEHP-SI-TIOG[90mM]
PACSR	PEHP-PACSR-[40mM]	PEHP-PACSR[-60mM]	PEHP-PACSR-[80mM]	PEHP-PACSR-[90m]

VI	PEHP				TYI			
	SUERO IRRADIADO		PACRS		SUERO IRRADIADO		PACRS	
	CO_2	SIN CO_2	CO_2	SIN CO_2	CO_2	SIN CO_2	CO_2	SIN CO_2
HISTAMINA [?]	PEHP-SI-CO_2-HIST	PEHP-SI-HIST	PEHP-PACSR-CO_2-HIST	PEHP-PACSR-HIST	TYI-SI-CO_2-HIST	TYI-SI-HIST	TYI-PACSR-CO_2-HIST	TYI-PACSR-HIST
TIOGLICOLATO [?]	PEHP-SI-CO_2-TIOG	PEHP-SI--TIOG	PEHPPACSR-CO_2-TIOG	PEHP-PACSR-TIOG	TYI-SI-CO_2-TIOG	TYI-SI-TIOG	TYI-PACSRI-CO_2-TIOG	TYI-PACSR-TIOG

I) PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO.- El procesamiento estadístico de los resultados obtenidos fueron sometidas a la prueba de Kolmogorov - Smirnov con el propósito de conocer la distribución. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la utilización del paquete estadístico SPSS.

J) El medio, adicionado con el medio condicionado por enterobacterias se analizó con los resultados más favorables de los descritos anteriormente empleando el método de alta tensión de CO_2 modificado.

K) De las condiciones que arrojaron resultados más favorables en la formación de estructuras semejantes a quistes, se procedió a realizarlo por triplicado en matraz.

L) Del inciso anterior, se procedió a experimentar con diferentes concentraciones de pH.

M) En cada uno de los ensayos se calculó el % de rendimiento de estructuras semejantes a quistes empleando Sarkosyl 0.1% - 0.2%.

N) Se ensayó una combinación de nutrientes a partir de TYI-PEHP-SUERO IRRADIADO y de TYI-PEHP-PACSR para probar su rendimiento en cuanto al crecimiento y producción de formas semejantes a quistes.

VII	PEHP - TYI	
	SUERO IRRADIADO (SI)	PACSR
* Histamina [?] * CO_2 * Cultivo estéril de Enterobacterias *pH [?]	PEHP-TYI- ENTEROBACTERIAS (SI) CO2-HISTAMINA - pH	PEHP-TYI -ENTEROBACTERIAS PACSR CO2-HISTAMINA-pH

RESULTADOS

A) RENDIMIENTO CELULAR Y CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE *E histolytica*, CRECIDA EN DISTINTOS MEDIOS UTILIZANDO SUERO IRRADIADO, SUERO FILTRADO O PACSR.

Los resultados de los ensayos del rendimiento de células y cinéticas de crecimiento de *E. histolytica* cuando se utilizó medio PEHP adicionado con suero irradiado, suero filtrado o PACSR se muestran en la Tabla 4 y figura 5 respectivamente. Se observó fase de adaptación en el medio PEHPS adicionado con suero filtrado y PACSR y el rendimiento máximo lo alcanzó a las 72 horas aproximadamente. (Tabla 4 y figura 7).

Tabla 4.- Comparación del rendimiento celular obtenido en el medio PEHP utilizando suero irradiado, suero filtrado o PACSR.

MEDIO	ADICIÓN DEL MEDIO	RENDIMIENTO CELULAR MÁXIMO (CEL/ML)
PEHP	Suero Irradiado (SI)	110,625
PEHP	Suero Filtrado (SF)	108,000
PEHP	PACSR	110,113

Estos resultados muestran que el medio PEHP adicionado tanto con suero irradiado como con PACSR presentan rendimientos muy semejantes y el PEHP adicionado con Suero filtrado presenta un rendimiento menor a los dos anteriores, pero sin una diferencia estadística significativa ($\alpha<0.05$) al emplear la prueba ANOVA.

Para el medio TYI adicionado con suero Irradiado, suero filtrado o PACSR el rendimiento máximo se alcanzó a las 96 horas aproximadamente en las tres condiciones. (Tabla 5 y figura 7)

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

MEDIO	ADICIÓN DEL MEDIO	RENDIMIENTO CELULAR MÁXIMO(CEL/ML)
TYI	Suero Irradiado (SI)	96,250
TYI	Suero Filtrado (SF)	89,375
TYI	PACSR	87,147

Estos resultados no presentan diferencia estadística significativa de acuerdo a la prueba ANOVA (α <0.05) aún cuando el medio TYI adicionado con suero irradiado muestra mayor rendimiento celular.

El medio PET al ser adicionado con suero irradiado o PACSR presentó un rendimiento máximo a las 72 horas aproximadamente, no presentando diferencia estadística significativa de acuerdo a la prueba ANOVA (α <0.05). (Tabla 6 y figura 7). No se utilizó suero filtrado por haber presentado una eficiencia igual o ligeramente menor (sin diferencia estadística significativa) al suero irradiado.

Tabla 6.- Comparación del rendimiento celular obtenido en el medio PET utilizando suero irradiado o PACSR.

MEDIO	ADICIÓN DEL MEDIO	RENDIMIENTO CELULAR MÁXIMO(CEL/ML)
PET	Suero Irradiado (SI)	198,000
PET	PACSR	181,200

Los resultados anteriores mostraron que el medio PET presentó una mayor eficiencia debido a que se observó un mayor rendimiento celular y un crecimiento más rápido (ver figura 5). Los resultados de la Tabla 7 muestran comparativamente el rendimiento celular entre los medios PET, PEHP y TYI utilizando suero irradiado, estos resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS empleando la prueba de una vía de Kolmogorov-Smirnov en la cual no se encontró diferencia estadística significativa entre los medios PEHP y TYI pero sí entre el PET y los medios PEHP y TYI.

Tabla 7.- Comparación del rendimiento celular obtenido en los medios PET,PEHP y TYI utilizando suero irradiado.

MEDIO	RENDIMIENTO CELULAR (CEL/ML)
PET	198,000
PEHP	110,625
TYI	96,250

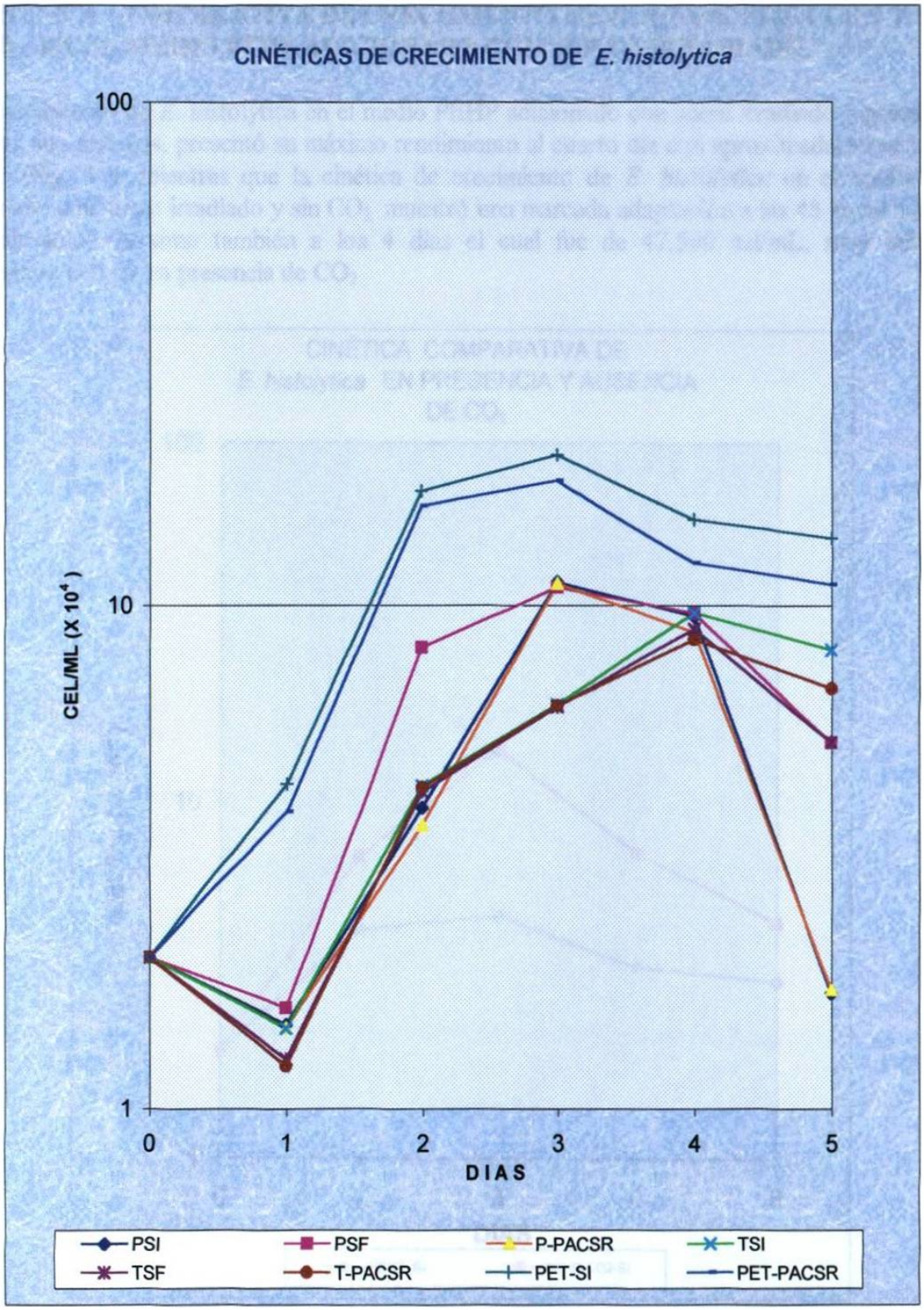

Fig 7.-Cinéticas de crecimiento de *Entamoeba histolytica* en los medio PEHP (P), TYI (T) y PET en presencia de suero irradiado (SI), suero filtrado(SF) o PACSR

B) CINÉTICA COMPARATIVA DE CRECIMIENTO DE *E. HISTOLYTICA* CON Y SIN CO_2 EN EL MEDIO PEHP ADICIONADO CON SUERO IRRADIADO.

El crecimiento de *E.* histolytica en el medio PEHP adicionado con suero irradiado y gaseado con CO_2 por dos minutos, presentó su máximo rendimiento al cuarto día con aproximadamente 138,125 cel/mL (Fig. 8), mientras que la cinética de crecimiento de *E. histolytica* en el medio PEHP adicionado con suero irradiado y sin CO_2 muestró una marcada adaptación a las 48 horas y alcanzó su rendimiento máximo también a los 4 días el cual fue de 47,500 cel/mL, muy inferior al rendimiento celular en presencia de CO_2.

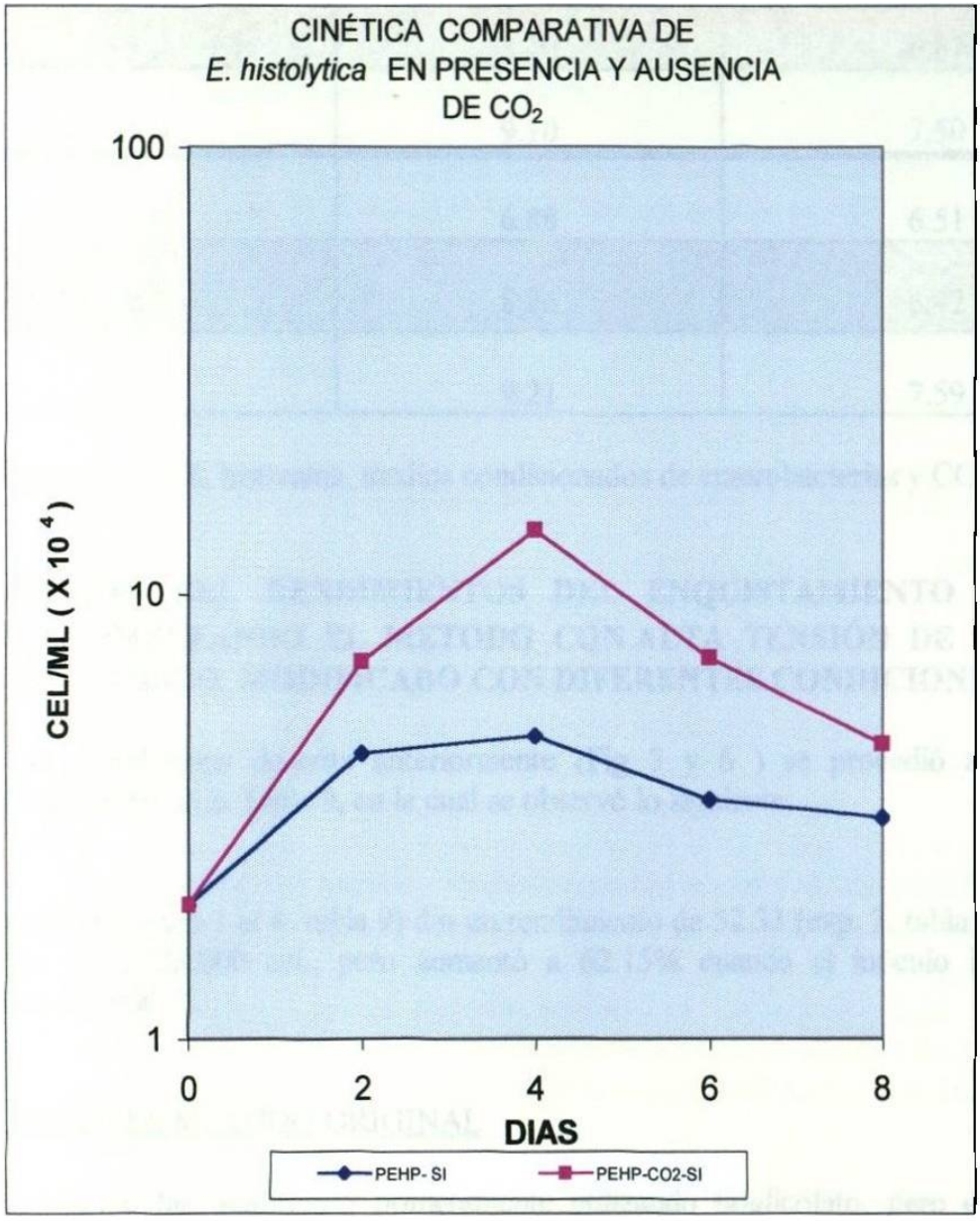

Fig. 8.- Cinéticas de crecimiento de *E. histolytica* en presencia y ausencia de CO_2

C) EFECTO DE LA HISTAMINA, CO_2 Y MEDIOS CONDICIONADOS CON ENTEROBACTERIAS EN EL pH DEL MEDIO PEHP Y EN EL MEDIO PETS.

Tabla 8.- Comparación del pH de los medios PEHP y PET antes y después de su esterilización.

Medio	pH del medio al momento de ser preparado	pH del medio después de ser esterilizado por vapor húmedo	pH final del medio después de añadir todos los suplementos* (incluido el inóculo)
PEHP	7.0	6.84	6.08
	8.0	8.20	6.87
	9.0	9.10	7.50
PET	7.0	6.88	6.51
	8.0	8.26	6.92
	9.0	9.21	7.59

* Suero irradiado o PACSR, histamina, medios condicionados de enterobacterias y CO_2.

D) COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTOS DEL ENQUISTAMIENTO DE *E.histolytica* EMPLEANDO EL MÉTODO CON ALTA TENSIÓN DE CO_2 Y EL MISMO MEDIO MODIFICADO CON DIFERENTES CONDICIONES

Empleando la metodología descrita anteriormente (Fig 5 y 6) se procedió a realizar los experimentos reportados en la Tabla 9, en la cual se observó lo siguiente:

El método original (exps 1 al 4, tabla 9) dio un rendimiento de 52.33 (exp. 3, tabla 9), cuando se usó un inóculo de 1,225,000 cel., pero aumentó a 62.15% cuando el inóculo inicial fue de 11,128,000 (exp.4, tabla 9).

MODIFICACIONES EL MÉTODO ORIGINAL

El método original fue modificado primeramente utilizando tioglicolato, pero éste más bien produjo una reducción en el rendimiento tanto con inóculos iniciales bajos (1,225,000 cels) así como inóculos iniciales altos (11,150,000 cels), (exps. 5 y 6 de la tabla 9).

La histamina produjo un aumento en el rendimiento de formas semejantes a quistes (resultados no mostrados.

Los experimentos del 7 al 10 muestran varias combinaciones de factores (medios condicionados de bacterias, histamina 0.3 mM y tioglicolato) utilizando inóculos iniciales bajos, pero todas estas combinaciones produjeron rendimientos muy reducidos.

En el experimento 11 se ensayó el medio condicionado con enterobacterias más la histamina 0.3 mM con un inóculo de 6,600,000 cel, dando un rendimiento de 52.73%, pero al aumentar la concentración de histamina a 0.6 mM (exps. 12 y 13 de la tabla 9) con las mismas condiciones que el exp. 11, la eficiencia se elevó a 73%.

En el exp. 14 (tabla 9) se repitieron las condiciones de los exps.12 y 13 (tabla 9), pero los cultivos fueron realizados en matraces triplicando las cantidades de cada factor excepto el inóculo, el resultado fue un incremento del rendimiento a 86.46%.

El experimento 15 se realizó bajo las mismas condiciones que el experimento 14 con la única diferencia de que el pH del medio se ajustó a pH 8.0, lo cual incrementó el rendimiento a 90.78%

Las condiciones de los experimentos 16 y 17 fueron idénticas a las del experimento 15 pero el tratamiento con sarcosyl se incrementó a 0.2 y 0.15% respectivamente, reduciendo el rendimiento a 60.24 y 76% también respectivamente.

MODIFICACIONES EN EL MÉTODO ORIGINAL Y EN EL MEDIO DE CULTIVO

El medio PET es una combinación de los medios PEHP y TYI y produce un rendimiento en el crecimiento de células de más del doble al que producen los medios de los cuales se deriva. Dado que es conocido que mientras mejor se encuentran las células fisiológicamente al momento de entrar en condiciones que inducen diferenciación mayor es el rendimiento de quistes producidos (esto ha sido observado en experimentos con *Entamoeba invadens*), se probó este medio con las condiciones que habían dado mejores resultados, con la única diferencia de un número mayor de células de inóculo (19,700,000 cel), ya que como antes se mencionó, con este medio el rendimiento en el crecimiento de células es muy alto. Los experimentos 18 y 19 (tabla 9) muestran que cuando se utilizó el medio PET con suero irradiado (PETS) (exp.18) y con PACSR (PETP) (exp.19) los rendimientos fueron de 91.4 y 90.0% respectivamente aún cuando se trataron con sarcosyl 0.15%.

En síntesis, podemos decir que las mejores condiciones encontradas para producir altos rendimientos de formas semejantes a quistes de *Entamoeba histolytica* son los dados en el exp.18 de la tabla 9, ya que con éstas condiciones se obtiene un mejor rendimiento aún después de tratar las células con sarcosyl al 0.15%.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS ESTRUCTURAS SEMEJANTES A QUISTES

Las estructuras semejantes a quistes fueron observadas por microscopio de campo claro, de contraste de fase, microscopía electrónica y microscopía de fluorescencia con un microscopio confocal. La Figura 9 muestra un agregado de formas resistentes a sarcosyl a través de microscopio de contraste de fase donde se pueden observar las células redondeadas en forma de agregados. Cuando se realizaron cortes semifinos teñidos con azul de toluidina se pudo observar

que cierto número de células aparecían multinucleadas y con la cromatina condensada en grumos, en la periferia de la membrana nuclear (Fig. 10), característica de quistes de *Entamoeba histolytica.*

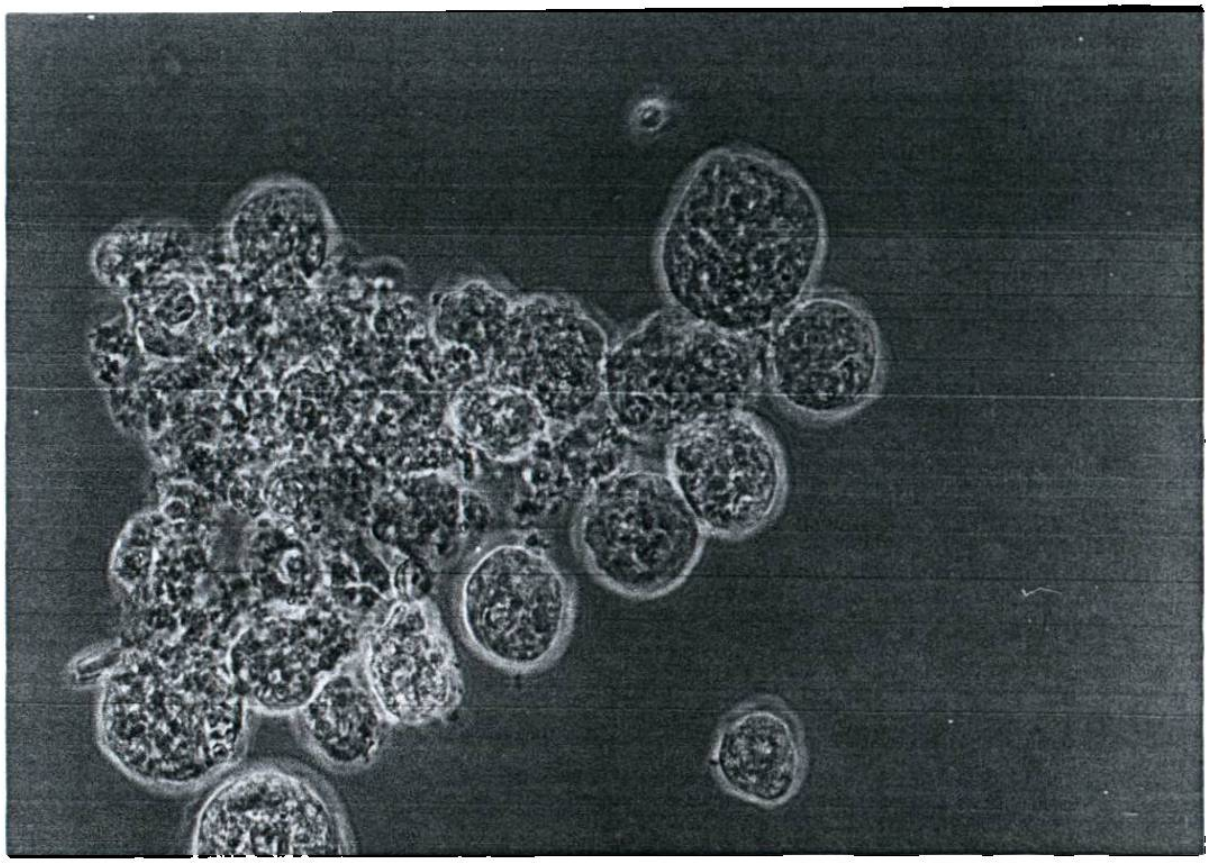

Figura 9.- Formas resistentes a sarcosyl de *Entamoeba histolytica* que muestran su característica capacidad de adherirse entre ellas.

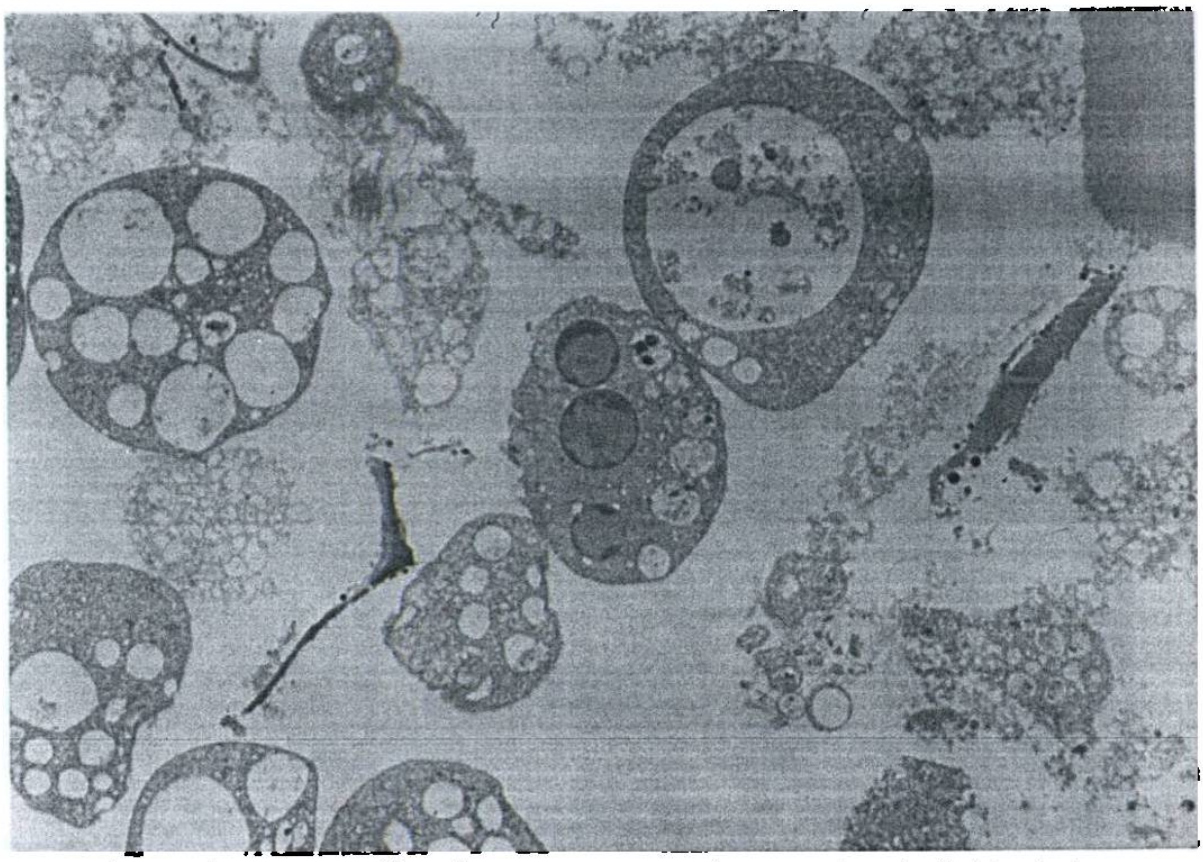

Figura 10.-Corte semifino de estructuras semejante a quiste de *E. histolytica,* en el cual se observan estructuras polinucleadas (7200 X).

Los cortes finos, observados por microscopía electrónica (Fig.11) mostraron la presencia de hélices ribonucleoproteícas, precursores de los cuerpos cromatoídes característicos de quistes. En la Figura 12 se observa también sobre la membrana celular una delgada cubierta que indica posiblemente la presencia de una incipiente pared celular.

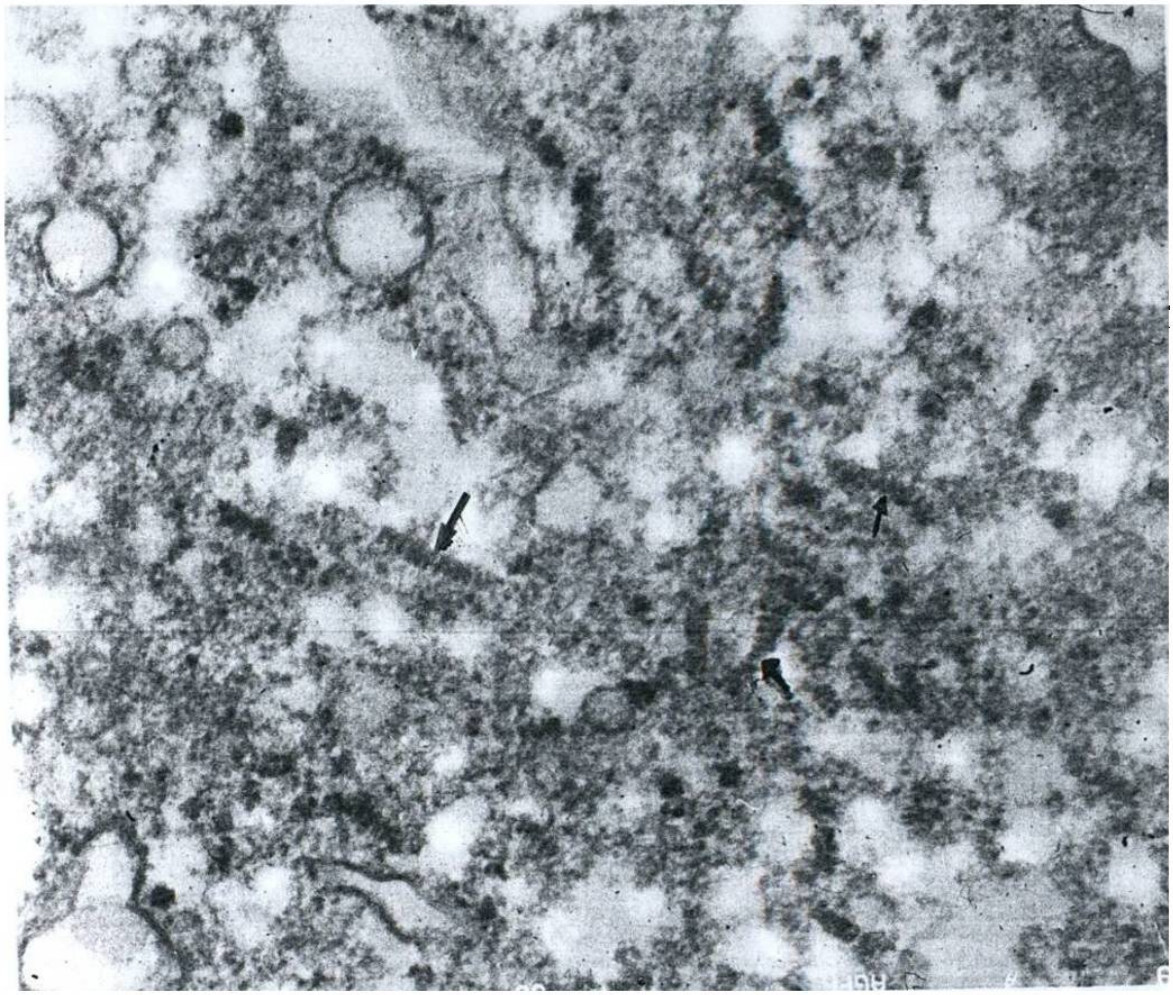

Figura 11.- Fotografía al microscopio electrónico de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica* en la cul se observa la presencia de cuerpos cromatoides o hélices de ribonucleoproteinas (flechas) (30,000X).

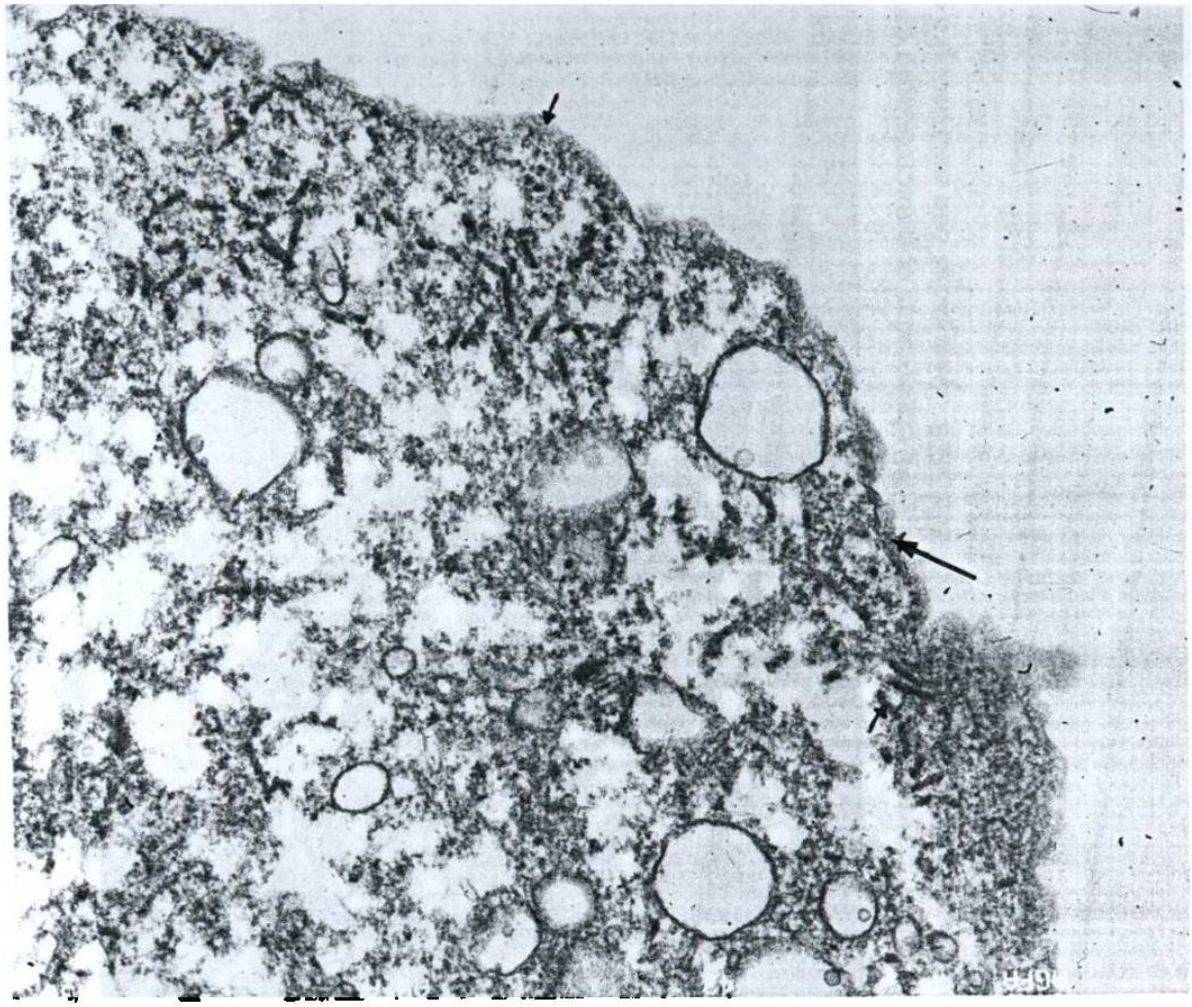

Figura 12.- Fotografía al microscopio electrónico de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica* en la cual se observa la presencia de cuerpos cromatoides o hélices de ribonucleoproteinas y la presencia de una incipiente pared celular (flecha). (12,000X).

Para demostrar la presencia de pared o al menos de una incipiente pared, las células se trataron con calcoflúor M2R, que es un colorante fluorescente que tiene afinidad por polímeros de glucosa, y ya que la pared de *Entamoeba invadens* presenta una pared formada por quitina, un polimero de N-acetil-glucosamina consideramos que el resto de las especies del género entamoeba presentan también éste polímero como un componente de la pared. La Figura 13 muestra que el calcoflúor M2R produce una fuerte fluorescencia en la forma semejante a quistes de *Entamoeba histolytica.*

13B

13A

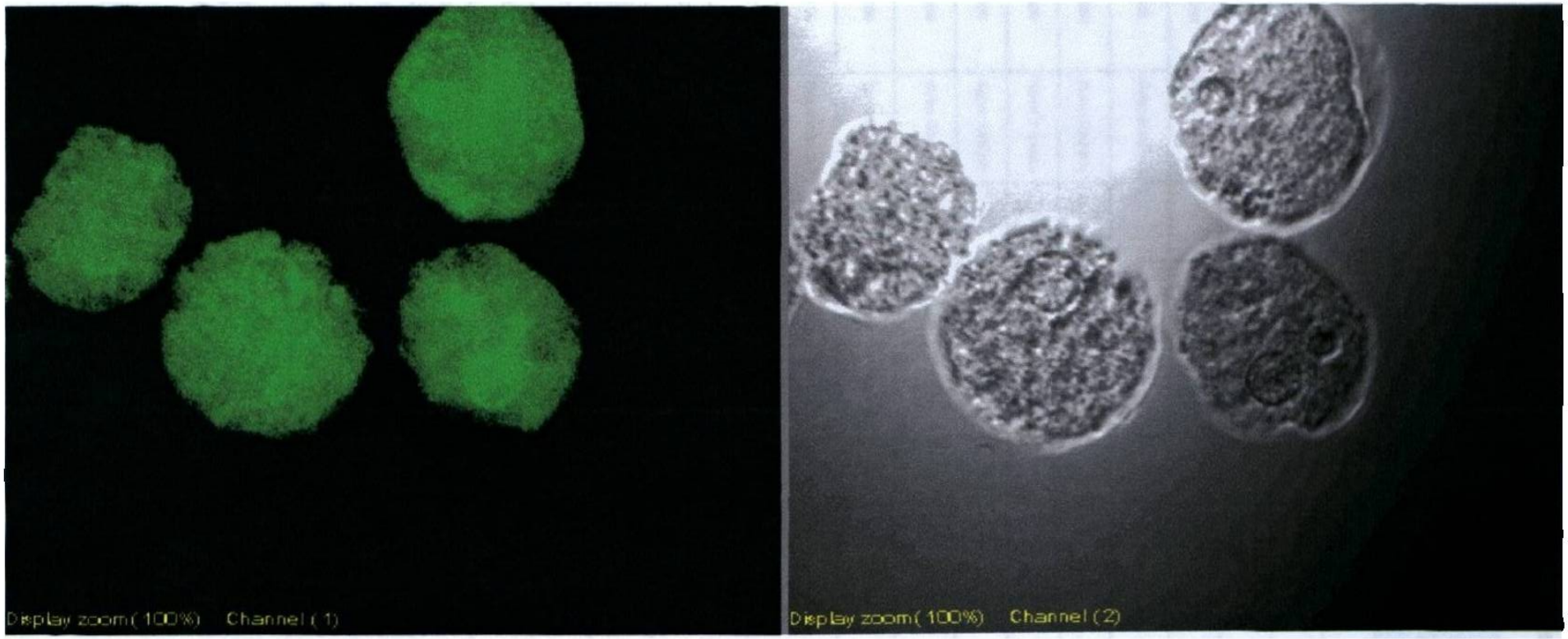

Figura 13.- Formas semejantes a quistes de *E. histolytica* resistentes a sarcosyl 0.15% observadas con microscopio confocal. A) Células en contraste de fase. B) las mismas tratadas con calcoflúor M2R observadas con microscopía de fluorescencia. La fluorescencia de fondo ha sido eliminada.

TABLA 9.- Comparación de resultados de las diferentes condiciones de enquistamiento para *Entamoeba histolytica*.

NÚMERO DE EXP.	MEDIO	TOTAL DE CÉLULAS POR EXPERIMENTO EN LA SEGUNDA FASE (DE ENQUISTAMIENTO)	MEDIO ADICIONADO CON:	ENTEROBACTERIAS		CONCENT. DE HISTAMINA (mM)	TIEMPO DE GASEO (MIN)	CONCENT. DE TIOGLICOLATO (µM)	pH DEL MEDIO	CONCENT. DE SARKOSIL (%)	RENDIMIENTO PROMEDIO (%)
1	PEHPS	1,275,000 *	PACSR				2		7	0.1	25.0
2	PEHPS	1,225,000 *	Suero filtrado				2		7	0.1	50.27
3	PEHPS	1,225,000 *	Suero irradiado				2		7	0.1	52.33
4	PEHPS	11,128,000 ***	Suero irradiado				2		7	0.1	62.15
5	PEHPS	1,225,000 *	Suero irradiado				2	0.87	7	0.1	20.15
6	PEHPS	11,150,000 ***	Suero irradiado				2	0.87	7	0.1	22.5
7	PEHPS	1,225,000 *	Suero irradiado	*E.coli* filtrado	*S.faecalis* filtrado	0.3	2	0.87	7	0.1	17.8
8	PEHPS	1,225,000 *	Suero irradiado				2	0.64	7	0.1	21.3
9	PEHPS	1,225,000 *	Suero irradiado	*E.coli* filtado	*S.faecalis* Filtrado	0.3	2		7	0.1	39.46
10	PEHPS	1,225,000 *	Suero irradiado	*E.coli* filtrado	*S.faecalis* Filtrado	0.3	2	0.64	7	0.1	22.5
11	PEHPS	6,6000,00 **	Suero irradiado	*E. coli* filtrado	*S. faecalis* filtrado	0.3	2		7	0.1	52.73
12	PEHPS	6,600,000 **	Suero irradiado	*E.coli* filtrado	*S. faecalis* filtrado	0.6	2		7	0.1	73.01
13	PEHPS	6,631,000 **	Suero irradiado	*E.coli* estéril	*S. faecalis* estéril	0.6	2		7	0.1	73.47
14	PEHPS (matraz)	6,631,000 **	Suero irradiado	*E.coli* estéril	*S. faecalis* estéril	0.6	6		7	0.1	86.43
15	PEHPS (matraz)	6,631,000 **	Suero irradiado	*E. coli* estéril	*S. faecalis* estéril	0.6	6		8	0.1	**90.78**
16	PEHPS (Matraz)	6,600,000 **	Suero irradiado	*E.coli* estéril	*S. faecalis* estéril	0.6	6		8	0.2	60.24
17	PEHPS (Matraz)	6,600,000 **	Suero irradiado	*E.coli* estéril	*S. faecalis* Estéril	0.6	6		8	0.15	76.0
18	PETS (Matraz)	19,700,000 **	Suero irradiado	*E.coli* estéril	*S. faecalis* Estéril	0.6	6		8	0.15	**91.4**
19	PETP (Matraz)	19,700,000 **	PACSR	*E.coli* estéril	*S. faecalis* Estéril	0.6	6		8	0.15	**90.0**

* Total de células provenientes de la concentración de 3 tubos.
** Total de células provenientes de la concentración de 8 tubos
*** Total de células provenientes de la concentración de 15 tubos.

Método original
Método original modificado
Método modificado y medio nuevo.

DISCUSIONES

Para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica* se han reportado los medios PEHPS (Said- Fernández y col, 1988) y el medio TYI-S-33 (Diamond y col, 1978), como medios ricos en componentes esenciales para el crecimiento axénico de éstas amibas; ambos medios requieren de ser adicionados con suero bovino estéril, suero filtrado o sustituto de suero denominado PACSR (Protein Axenic Cultire Serum Replacement).

En este trabajo realizamos una mezcla de nutrientes esenciales para el desarrollo de células de *E. histolytica* al cual denominamos medio PET , el que resulta más eficiente que los medios empleados hasta ahora para el cultivo de esta amiba, lo cual se aprecia con las cinéticas comparativas mostradas en resultados; este resultado se puede asumir como consecuencia de la complementariedad de nutrientes que presenta el medio PET debido a que el rendimiento que proporciona este medio permite obtener más del doble al que se obtiene en el medio TYI o PEHP adicionados con suero irradiado. También es evidente el ahorro económico que el medio PET representa ya que el rendimiento celular en este medio es casi semejante cuando se suman los rendimientos celulares de los medios TYI más el rendimiento celular del medio PEHP, esto indica que en el medio PET se emplea la mitad de reactivos y se obtiene más del doble del rendimiento celular. Además considerando que para inducir el enquistamiento de *E. histolytica* se requieren grandes cantidades de células es evidente la ventaja de cultivar esta amiba en el medio PET.

En cuanto al cultivo y al enquistamiento de *Entamoeba histolytica* en el medio PET el empleo de suero irradiado o PACSR no muestran diferencia significativa por lo cual se recomienda el uso de PACSR debido a las desventajas que presenta el suero.

En este trabajo se determinó que para la inducción de la formación de estructuras semejantes a quistes el pH fue un factor importante para aumentar el rendimiento (compárense exps. 14 y 15 de la tabla 9). El gaseo de los tubos produce una acidificación en el medio de aproximadamente una unidad de pH, por lo cual el pH del medio finalmente era de aproximadamente 6.0 cuando se ajustaba a 7.0; por ésta razón cuando se ajustó el pH a 8.0 en el medio de cultivo el pH final, justo antes de incubar fue de 6.92 en el medio PET y de 6.87 en el medio PEHP.

El inóculo inicial de células en la fase de enquistamiento del método fue también importante (compárense exps. 3 y 4, tabla 9). Por otra parte, en los experimentos donde se obtuvo la más alta eficiencia de formas semejantes a quistes (exps. 18 y 19, tabla 9), se realizaron con inóculos mucho mayores que los experimentos anteriores. Esta diferencia de inóculo inicial se usó únicamente con el medio PET por la ventaja que presenta de producir mucho más alto rendimiento en el crecimiento de células.

PERSPECTIVAS

Algunos autores han sugerido que las cepas de *E. histolytica* han perdido su capacidad de enquistamiento por un largo tiempo en cultivo, ésta idea nació por el hecho de que no había podido encontrarse un medio que indujera al menos, algunas características del quiste. Sin embargo los resultados aquí encontrados muestran la posibilidad de la inducción *in vitro* de quistes maduros de *E. histolytica*. La obtención de quistes de *E. histolytica* permitirá el estudio del proceso del enquistamiento y la posibilidad de un control de la amibiasis a nivel de organismo (hospedero) y del medio ambiente.

CONCLUSIONES

- Se ha encontrado una metodología que induce la formación *in vitro* de estructuras semejantes a quistes de *Entamoeba histolytica*

- Se ha encontrado un nuevo medio de cultivo para *Entamoeba histolytica* que proporciona mejores rendimientos en el crecimiento de *Entamoeba histolytica* y en la formación de estructuras semejantes a quistes de *Entamoeba histolytica*.

BIBLIOGRAFÍA

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

Barreda-Abascal R. (1999) Epidemiologia de la amibiasis intestinal, Cuarta reunión de expertos en amibiasis , SEARLE, Primera edición 1-5

Balamuth W. (1951) Biological Studies on *Entamoeba histolytica*. J. Infect. Dis. **88**:230-236.

Balamuth W. (1946) Improved egg yolk infusion for cultivation of *Entamoeba histolytica* and Other intestinal protozoa. Am. J, Cloin. Path. **16**:380-384.

Boeck W.C. y Drbolhav J. (1925). The cultivation of *Entamoeba histolytica*. Am. J. Hyg. **5**:371-407.

Bos HJ (1979) *Entamoeba histolytica*: Cytopathogenicity of intact amebae and cell-free extracts, isolation and caracterization of an intracellular toxin. Exp. Parasitol. **47**:369-377

Campos R., Barranco C. Isibasi A. Y Kumate J. (1986) Papel de la Histamina en la respuesta inmune local anti-amiba. X Seminario sobre amibiasis pag. 75

Campos-Góngora E. (1996) Incremento de la síntesis de quitina en quistes de *Entamoeba histolytica* por efecto de Mg^{+2}, Mn^{+2} y Co^{+2}. Tesis inédita, FCB, UANL.

Chang S.L. (1946) Studies in *Entamoeba histolytica* IV. The relation of oxidation reduction potentials to the growth, encystations and existation of *Entamoeb ahistolytica* in culture. Parasitology **37**:101

Chinn B, Jacobs L, Reardon L. and Rees C. (1942) The influence of the bacterial flora on the cultivation of *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med. **22**:137-146

Cleveland and Sanders, 1930. Encystation, multiple fission without encystment, excystation, metacystic development and variation in a pure line and nine strains of *E. histolytica* Arch. Protistenk **70**:223-266

Das S. y Guillin FD (1991) Chitin synthase in encysting of *Entamoeba invadens. Biochem J.* **280**: 641-647

Diamond LS (1961) Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science **134**:336-337.

Diamond LS (1968) Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba histolytica* –like amebae. J. Parasitol . **54**: 1047-1056

Diamond LS, Harlow D. y Cunnick CC (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans. R. Soc. Trop. Med. 72:431-432

Eagle H. (1959) Aminoacid metabolism in mammalian cell cultures. Science **130**:432-437

Freshney RI (1987) culture of animal cell. A manual of basic techniques. John Wiley & Sons. New York. Pp 57-85.

Horst MN (1981) The biosynthesis of crustacean chitin by a microsomal enzyme from larval brine shrimp. J. Biol. Chem. **256**: 1412-1419

Imperato P. J. (1981) A historical overview of amebiasis. Bull, N. Y. Acad. Med. **57**: 175.

Jacobs l. (1947) The elimination of viable bacteria from cultures of *Entamoeba histolytica* and the subsequent maintenance of such cultures. Am. J. Hyg. **46**: 172-176

Kobiler D., Mirelman D. y Mattern CFT (1981) Lectin and toxin-like activities of *Entamoeba histolytica*: comparison of propierties. Am. J. Trop. Med. Hyg. **30**: 955.959

Lazos Ochoa M. (1994) Parologia y patógena de la amibiasis, Sesgunda Reunión de Expertos en amibiasis. SERLE, Primera Edición 41-52.

Lushbaugh W, Kailarra AB, Hofbauer AF, Arnaud P, Camtey JR. y Pittman FE. (1981) Inhibition of *E. histolytica* cytotoxin by alfa-I-antiprotease and alfa-2-macroglobulins. Am. J. Trop. Med. Hyg. **30**: 575

López-Romero, E. y Vilagómez-Castro, J. C., 1993. Encystation in *E.invadens*. Parasitology Today **9**:225-227.

Lynch EC, Rosenberg MI, Gitler C (1982). An ion chanel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*.EMBO J.**1**:801-804

Mata-Cárdenas, B. D. y Saíd-Fernández, S. (1986). Wall synthesis in axenic cultures of *E.histolytica* grown in PEHPS medium Arch. Invest. Med. **25**:25-30.

Mata- C-ardenas BD y Saíd-Fernández S. (1990) Development of a simplified médium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Arch. Inv. Med. **21**:247-251.

Mata-Cárdenas BD, Morales-Vallarta MR, Vargas-Villegas J. Y Saíd-Fernández S.(1997) Long-term subcultivation in axenic conditions of *Entamoeba histolytica* in a serum-free media. Arch. Med. Res. **28**:106-107.

Mata-Cárdenas BD, Morales-Vallarta MR, Vargas-Villegas J. y Saíd-Fernández S.(1996). PACSR: A Serum repleacement for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **90**:586.

Mc Connachie EW. (1969). The morphology, formation and development of cyst of *Entamoeba*. Parasitology. **59**:41.

Mc Connachie EW. (1962). A medium for the axenic cultivation of *E. invadens*. Nature **194**:603-604.

Morales-Vallarta M. and Villarreal-Treviño L., 1997. *Entamoeba invadens* diferentiation and *Entamoeba histolytica* cyst-like formation induced by CO_2. Arch. Med. Res. **28**:150-151.

Muñoz ML, Calderón J. y Rojkind M. (1982). The collagenase of *Entamoeba histolytica*. J. Exp. Med. **155**:42.51.

Nayeem MA, Habibulla CM, Saleem Y, Ishaq M& Quadri GSA (1993) *In vitro* encystation and excystation ef *Entamoeba histolytica* trophozoites. In. J. Exp. Biol. **31**:562-563

Neff RJ. Y Benton WF (1964) Localization of cellulose in the cysts of *Acanthamoeba sp.* J. Protozool **9**: 11-13

Nelson EC. (1947) Alcoholic extract medium for the diagnosis and cultivation of *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med. **27**: 545-552.

Orozco-Orozco, M.E. y col. (1999). Un camino hacia la vacuna contra la amibiasis. Cuarta Reunión de Expertos en Amibiasis. SEARLE, Primera Edición 57-65.

Padilla-Raygoza N. (1999). Amibiasis en Edad Pediátrica,Cuarta Reunión de Expertos en Amibiasis. SEARLE, Primera Edición 47-55.

Romero-Caballero R. (1994) Introducción de Amibiasis, Segunda Reunión de Expertos, SEARLE de México, Primera Edición 7-11.

Rees CW., Reardon LV., Jacobs L. y Jones F (1941). Pr5oblems encountered in the growth of *Entamoeba histolytica* cultures developed by microisolation. Am. J. Trop. Med. **21**:567-578.

Said-Fernández,S., Vargas-Villegas, J., Castro-Garza, J., Mata Cárdenas, B. D., Navarro-Marmolejo, L., Lozano-Garza, G. y Martínez-Rodríguez, H. (1988). PEHPS medium: An alternative for axenic cultivation of *E. histolytica* and *E. invadens*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **82**:249-253.

Silverman, JD, Clarck, CG, Diamond, LS, Sogin, ML, (1999) Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small subunit ribosolal. RNA genes sequence analysis. Mol. Biol. Evol. **16**:1740-1751.

Stoll NR. (1957) Axenic culture of *E. invadens* in the absence of tissue. J. Prot. **4**:6

TIPO DE ADQUISICION
DONATIVO