



U.N.A.M. CAMPUS IZTACALA  
 U. D. C. PROCESOS TECNICOS  
 PAPELETA DE DEVOLUCION

U.N.A.M. CAMPUS  
 IZTACALA

EL LECTOR SE OBLIGA A DEVOLVER ESTE LIBRO  
 COMO LIMITE EN LA FECHA INDICADA EN  
 EL ULTIMO SELLO.

U.N.A.M. CAMPUS  
 IZTACALA

[Redacted text]

PROFESIONALES IZTACALA.

ESTUDIO COMPARATIVO DE ISOENZIMAS DE TROFOZOITOS  
 Y QUISTES DE Entamoeba invadens Rodhain, 1934.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
 BIOLOGO PRESENTA:  
 FRANCISCO TREJO ISLAS.

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO. 1991.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria:

Dedico este trabajo a :

mi papá y mi mamá: Joaquín Trejo Sanchez, Tomasa Islas de Trejo

mis hermanos: Joaquín, Patricia, Veronica y Antonio Trejo Islas.

mi director de tesis: Dr. Angel Arroyo Begovich.

mis tíos: Francisco Pliego, Ofelia Islas.

mis amigos de la Facultad: Manuel García Lorenzo, René Ortíz Pérez,

Alfredo Delgado Ramírez, Alberto Esquivel Romero, Ernesto Caballero Armenta

Leonor García Perez, Antonio de Anda Montañez, Alejandro Ortega Aragón,

María de Jesús Ortega, Peter Müller, Jaime Gómez Jimenez, Rafael Aguilar

Cortéz, Victor Gonzales Valdéz, Leticia Flores Grimaldo, Victor Blanca,

Sergio Vaca, Patricia Jacques, Gregoria Jacques, Mario Cardenas León,

Mauricio Hernandez, Irene Elizalde, Carmen Elizalde, Susana, Mónica, Mayte,

Isidro, Cesar Ovando Ishikawa, McCloud, Juan Carlos, Ma. Elena, Laura, Norma,

Karla, el chino, Francisco Huichán, Azuara, etc.

mi maestro de atletismo: Luis Haro

mi maestro de física y basket-bol: Raúl Gallardo Villegas.

a mis compañeros de trabajo: Alberto Medina, Emilio Romano, Tere Nuñez

al Dr. Ruy Perez Monfort por sus comentarios,

a la Dra. Aurora Brünner Liebshard.

al Dr. Antonio Peña Diaz. Director del Instituto de Fisiología Celular.

#### TESIS.

La presente tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Angel Arroyo Begovich Investigador Titular de Tiempo Completo del Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

#### AGRADECIMIENTOS.

Agradezco profundamente la paciencia y gentil dirección del Dr. Angel Arroyo Begovich.

## INDICE.

Lista de abreviaturas.....	i
Lista de figuras y tablas.....	ii.
RESUMEN.....	iv.
I.INTRODUCCION.....	1.
A)Generalidades.....	1.
a)Biología de <u>E.invadens</u> .....	1.
1)Ubicación taxonómica.....	1.
2)Ciclo de vida.....	1.
b)Biología del trofozoíto de <u>E.invadens</u> .....	3.
1)Morfología y ultraestructura de los trofozoítos de <u>E.invadens</u> .....	3.
2)Bioquímica y composición de las membranas celulares de <u>E.invadens</u> .....	5.
3)Genoma de <u>E.invadens</u> .....	7.
4)Respiración de <u>E.invadens</u> .....	8.
5)Temperatura óptima de crecimiento de <u>E.invadens</u> .....	9.
6)Características del crecimiento de <u>E.invadens</u> .....	10.
7)Hiperparasitismo en <u>E.invadens</u> .....	10.
8)Huéspedes de <u>E.invadens</u> y patogenicidad.....	10.
9)Citotoxicidad y factores de virulencia de <u>E.invadens</u> .....	11.
10)Estructura antigénica de los trofozoítos y respuesta inmune en la amibiasis producida por <u>E.invadens</u> .....	14.
11)Isoenzimas de <u>E.invadens</u> .....	15.
c)Biología de los quistes de <u>Entamoeba</u> .....	16.
1)Generalidades.....	16.
2)Morfología y ultraestructura.....	17.
3)Los cuerpos cromatoides de <u>E.invadens</u> .....	19.

- 4).Variaciones en el tamaño de los quistes de Entamoeba. ....23.
- 5).Biosíntesis, estructura y composición de la pared celular de los quistes de E.invadens. ....24.
- 6).Variaciones bioquímicas en el enquistamiento de Entamoeba. ....27.
- 7).Síntesis de DNA, transcripción y traducción durante el enquistamiento en Entamoeba. ....28.
- 8).Enquistamiento y división celular. ....32.
- 9).Métodos de inducción del enquistamiento en Entamoeba. ....32.
- 10).Variaciones de la densidad celular durante el enquistamiento. ....35.
- 11).Factores que afectan el enquistamiento de Entamoeba. ....36.
- 12).Enquistamiento y virulencia en Entamoeba. ....38.
- 13).Relación de las bacterias y el enquistamiento en Entamoeba. ....39.
- 14).Supervivencia de los quistes de Entamoeba. ....42.
- 15).Efectos de la temperatura sobre la viabilidad de los quistes de Entamoeba. ....42.
- 16).Efectos de las sustancias químicas sobre la viabilidad de los quistes de Entamoeba. ....43.
- 17).Desenquistamiento y factores asociados en Entamoeba. ....44.
- 18).Estructura antigénica de los quistes de E.invadens. ....46.
- II.OBJETIVOS. ....47.
- III.MATERIAL Y METODOS. ....49.
  - 1)Cepa empleada. ....49.
  - 2)Medio de cultivo. ....49.
  - 3)Medio de enquistamiento. ....49.
  - 4)Mantenimiento de los cultivos. ....49.
  - 5)Conteo de las células. ....51.
  - 6)Cultivo y cosecha de los trofozoítos. ....51.

7)	Enquistamiento de los trofozoítos su cosecha y purificación. ....	52.
8)	Método de purificación de los quistes de <u>E.invadens</u> .....	53.
9)	Preparación de los extractos libres de células de trofozoítos y quistes. ....	54.
10)	Determinación del contenido de proteínas de los extractos de trofozoítos y quistes de <u>E.invadens</u> IP-1.....	55.
11)	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	55.
12)	Detección de las bandas con actividad enzimática en los geles de poliacrilamida.....	57.
IV)	RESULTADOS.....	63.
V)	DISCUSION.....	95.
VI)	CONCLUSIONES.....	99.
VII)	BIBLIOGRAFIA. ....	100.

## Lista de abreviaturas.

CAP. Ceramida aminoetil fosfonato.  
CEP. Ceramida etanolamina fosfato.  
CFI. Ceramida fosforil inositol.  
CPE. ceramida fosforil etanolamina.  
E.C. Catálogo de enzimas de la IUB.  
2-4 DNP. 2,4 dinitrofenol.  
EFM. Esfingomiélinea.  
EDTA. Etilendiaminatetraacetato.  
FC. Fosfatidilcolina.  
FS. Fosfatidilserina.  
FEA. Fosfatidiletanolamina.  
FI. Fosfatidilinositol.  
%G-C. Porcentaje de guanina-citosina en el DNA.  
Kd. Kilodaltons.  
xg. Múltiplos de la gravedad  
PMS. Metasulfato de Fenazina.  
MTT. Metil-tiazolil-tetrazolium.  
NacGal. N-acetil-galactosamina.  
NacGlu. N-acetil-glucosamina.  
PAGE. Electroforesis en geles de poliacrilamida.  
SDS. Dodecilsulfato de sodio.  
TEMED. Tetrametiletildiamina.  
Timidina-H<sup>3</sup>. Timidina marcada radioactivamente con tritio.  
Tris. Hidroximetilaminometano.  
PBS. amortiguador de fosfatos salino.

Lista de figuras y tablas.

Figura 1.-Ciclo de vida de Entamoeba invadens.....2.

Figura 2.-Fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra comparativamente la actividad de la enzima hexokinasa de trofozoítos y quistes de E.invadens IP-1.....68-69.

Figura 3.-Fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra comparativamente la actividad de la enzima glucosa fosfato isomerasa de trofozoítos y quistes de E.invadens IP-1.....71-72.

Figura 4.-Fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra comparativamente la actividad de la enzima malato deshidrogenasa descarboxilante de trofozoítos y quistes de E.invadens IP-1.....73-74.

Figura 5.-Fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra comparativamente la actividad de la enzima fosfoglucomutasa de trofozoítos y quistes de E.invadens IP-1.....75-76.

Figura 6.-Fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra comparativamente la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa NADP dependiente de trofozoítos y quistes de E.invadens IP-1.....78-79.

Figura 7.-Fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra comparativamente la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa NAD dependiente de trofozoítos y quistes de E.invadens IP-1.....80-81.

Figura 8.-Fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra comparativamente la actividad de la enzima amilasa de trofozoítos y quistes de E.invadens IP-1.....82-83.

Figura 9.-Fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra comparativamente la actividad de la enzima quitinasa de trofozoítos y quistes de E.invadens IP-1.....85-86.

Figura 10.-Fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra comparativamente la actividad de enzimas proteinasas de trofozoítos y quistes de E.invadens IP-1.....88-89.

Figura 11.-Fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra comparativamente la actividad de las enzimas esterasas de trofozoítos y quistes de E.invadens IP-1.....90-91.

Figura 12.-Fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra comparativamente la presencia de ferroproteínas de trofozoítos y quistes de E.invadens IP-1.....93-94.

Lista de tablas.

Tabla I.Composición del medio de cultivo axénico TYI-S-33 para Entamoeba.. 50.

Tabla II.Porcentaje de enquistamiento y purificación de quistes de E.invadens IP-1.....66.

## RESUMEN.

En este trabajo se realizó un estudio comparativo de isoenzimas de trofozoítos y quistes de E.invadens IP-1, con objeto de buscar marcadores bioquímicos asociados con el enquistamiento de los trofozoítos. Para lograr este propósito se estudiaron algunas enzimas del metabolismo de los carbohidratos: hexokinasa, glucosa fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, malato deshidrogenasa descarboxilante, que participan como enzimas intermediarias en la vía metabólica de la degradación de la glucosa. Las enzimas alcohol deshidrogenasa NADP y NAD dependientes que participan en los pasos terminales de la degradación de la glucosa, las enzimas amilasa y quitinasa asociadas con la acumulación de glucógeno y la síntesis de la pared celular en los quistes. Las enzimas hidrolíticas inespecíficas estererasas y proteinasas y las proteínas no enzimáticas ferroproteínas. Como resultado de nuestro estudio encontramos datos que sugieren que no hay variación de isoenzimas en las siguientes enzimas: hexokinasa, glucosa fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, malato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa NADP y NAD dependientes, pero si hay modificaciones perceptibles en las isoenzimas de las enzimas amilasas, quitinasas, proteinasas y estererasas. Las ferroproteínas que detectamos mostraron variaciones cuantitativas pero no cualitativas entre quistes y trofozoítos. Los datos que se obtuvieron son compatibles con la visión de que durante el enquistamiento algunas áreas del metabolismo del trofozoíto se modifican notablemente en los quistes mientras otras no. Sugerimos que el uso de isoenzimas es una metodología poderosa para analizar las regiones del metabolismo que sufren modificaciones cuando el trofozoíto se transforma en quiste en este parásito. Además se hace una revisión de la biología del trofozoíto y el quiste del parásito E.invadens.

## I. INTRODUCCION.

### A.Generalidades.

#### a)Biología de E.invadens.

##### 1)Ubicación taxonómica.

E. invadens Rodhain,1934 es un organismo con la siguiente ubicación taxonómica(Grassé,1952,Levine y col.,1980):

Reino:Animal.

Subreino:Protozoa(Goldfuss,1817,Von Siebold,1848).

Phylum:Sarcomastigophora. (Honingberg&Malamuth,1963).

Subphylum:Sarcodina. (Schmarda,1871).

Superclase:Rhyzopoda(Von Siebold,1845).

Clase:Lobosea. (Carpenter,1961).

Subclase:Gimnamoebia(Haeckel,1862).

Orden:Amoebida. (Erhenberg,1830).

Suborden:Tubulina(Bovee&Jahn,1966).

Familia:Entamoebidae(Calkins 1933).

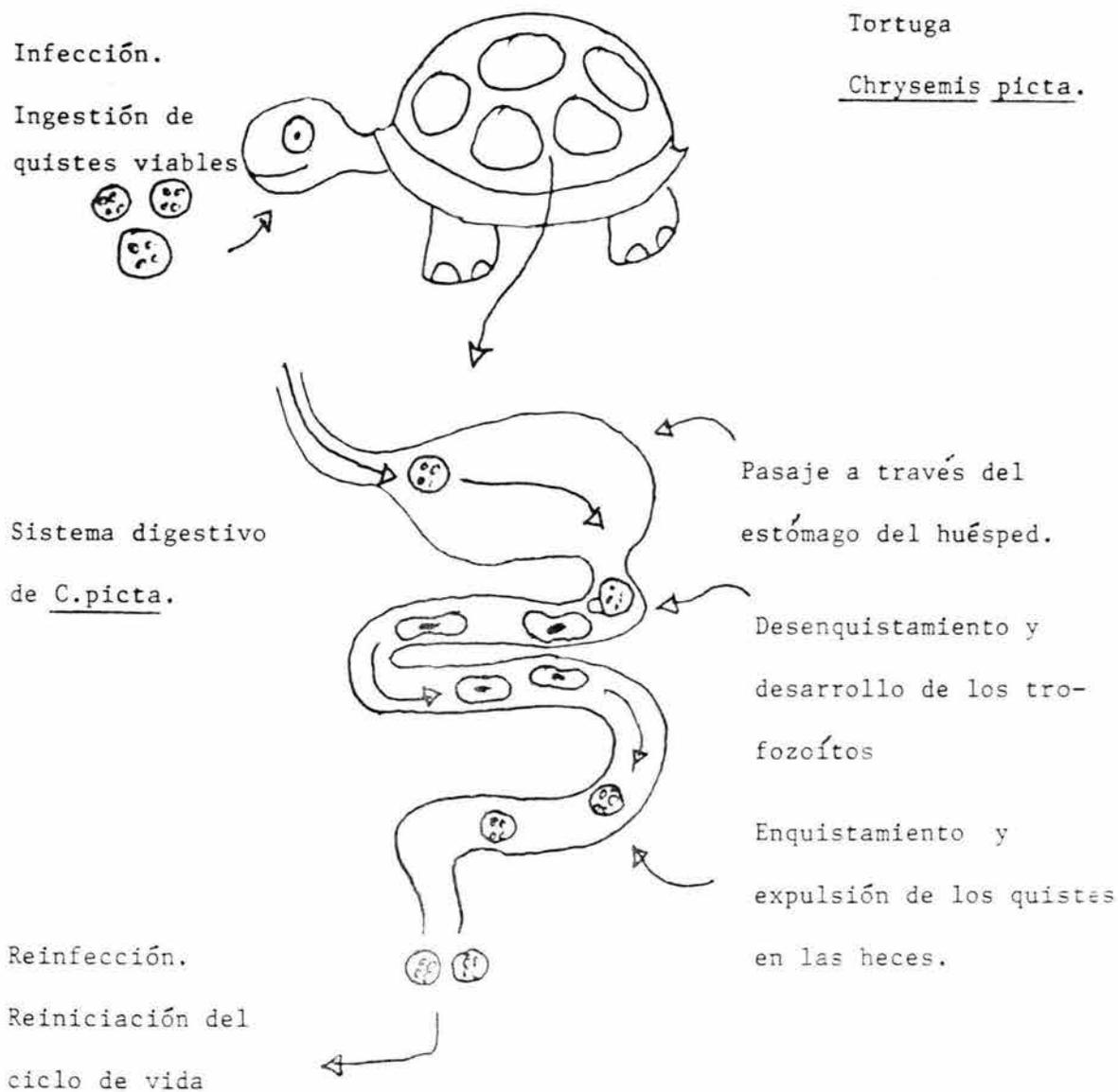
Género:Entamoeba(Casagrandi&Barbagallo,1895).

Especie:invadens. (Rodhain,1934).

##### 2)Ciclo de vida.

E. invadens tiene un ciclo de vida con 4 etapas distinguibles morfológicamente:Fase de trofozoíto,fase de prequiste,fase de quiste y fase de trofozoíto metaquístico.La tortuga Chrysemis picta huésped natural (Meerovitch,1958) se infecta mediante la ingestión de quistes viables que desenquistan en el intestino del huésped.Del quiste emerge un trofozoíto tetranucleado que se divide dando lugar a trofozoítos uninucleados(ocho) que se fijan a la pared intestinal maduran y pasan a la fase

Figura 1.-Ciclo de vida de E.invadens.



Nota. En otros reptiles, particularmente las serpientes, E. invadens invade la mucosa intestinal y causa amibiasis invasiva.

de trofozoíto activo, se alimentan, se dividen varias veces y aumentan su número. Por razones no conocidas algunos trofozoítos cesan de alimentarse y de moverse y el volumen del contenido de sus vacuolas citoplásmicas disminuye se redondean y rodean de una pared celular. Simultáneamente los cuerpos ribonucleoproteicos del citoplasma se agrupan formando barras cromatóideas alargadas con extremos aciculares. En esta fase de su ciclo de vida se le llama quiste. El núcleo del quiste se divide y forma 4 núcleos en los quistes maduros. Los quistes se dispersan en gran cantidad en las heces. Para que el ciclo de vida se reinicie los quistes necesitan ser ingeridos por un huésped apropiado ya que su viabilidad es limitada. Su ciclo de vida es idéntico al de E. histolytica que parasita humanos y es causante de la amibiasis humana (Kudo, 1960, Cheng, 1973, Geiman y Ratcliffe, 1936, Cervantes y col, 1980, Dobell, 1928).

b) Biología del trofozoíto de E. invadens.

1) Morfología y ultraestructura.

E. invadens forma parte de un conjunto de organismos denominados amibas que agrupa especies heterogéneas filogenéticamente que comparten la característica de poseer una morfología altamente variable. Es un organismo unicelular que posee una membrana plasmática sumamente dinámica rodeando un citoplasma capaz de fluir en todas direcciones. El trofozoíto mide 15.9  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio y presenta un núcleo de 4.78  $\mu\text{m}$  promedio con un endosoma opaco a los electrones que ocupa 20% del núcleo en la región central, gránulos de cromatina condensada en la cara interna de la membrana nuclear y vesículas intranucleares sin función definida (Geiman & Ratcliffe, 1936, Siddiqui & Rudzinska, 1965, Rondanelli y col, 1966). El núcleo está contenido por una membrana nuclear que presenta poros en su

superficie(Deutch&Zaman,1959).En el citoplasma no presenta mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático.Presenta gránulos electroden-  
sos constituidos de glucógeno y gotas de material lipídico distribuidas  
sin patrón definido,ribosomas,polisomas y conjuntos de ribosomas en dis-  
posición helicoidal sobre haces de filamentos paralelos denominados  
cuerpos ribonucleoproteicos.Posee un sistema vacuolar endocítico muy de-  
sarrollado constituido de vacuolas de tamaño y morfología variable(Sidi-  
qui&Rudzinska,1965,Rondanelli y col,1966,Deutch y Zaman,1958).La membra-  
na plasmática tiene estructura trilaminar.En la cara citoplasmática de  
la membrana se detectan gránulos ovalados sin función definida denomina-  
dos cuerpos ovals intramembranales.(Rondanelli y col,1966).La membrana  
presenta receptores para Concanavalina A.(Trissl y col,1976).La región  
más externa de la membrana presenta una cubierta que se denominó gluco-  
calix análoga a la de las células animales(Siddiqui&Rudzinska,1965).E.  
invadens presenta gran actividad fagocítica y pinocítica.Un estudio de  
microscopía electrónica de la fagocitosis del almidón mostro que duran-  
te la fagocitosis hay emisión de pseudópodos,rodeo de la partícula y  
endocitosis.(Zaman,1962).La pinocitosis también se ha estudiado en el  
trofozoíto,en medio axénico ésta es el mecanismo principal para captu-  
rar materiales nutritivos.Durante la pinocitosis aparecen vesículas pi-  
nocíticas y se forman canales que se invaginan dentro del trofozoíto.  
Las vesículas estan limitadas por una región submembranal de material  
fibrilar,probablemente componentes del citoesqueleto(Martínez Palomo y  
col,1976,Rondanelli y col,1968,Geiman y Ratcliffe,1936).

## 2) Bioquímica y composición de las membranas celulares de E. invadens.

Comparativamente con otros aspectos de su fisiología las membranas de E. invadens se han estudiado con detalle. (McLaughlin y Meerovitch, 1975, 1975a, Van Vlieth y col., 1976). Se les ha aislado mediante centrifugación diferencial. La membrana presentó alto contenido de colesterol, fosfolípidos, esfingolípidos y fosfolípidos. De los lípidos complejos, la fosfatidilcolina (FC) fue el componente principal. También se identificaron fosfatidilserina (FS), fosfatidiletanolamina (FEA), fosfatidilinositol (FI), esfingomielina (EFM), ceramidafosforilinositol (CFI), ceramidafosfoniletanolamina (CPE), ceramidaetanolaminafosfato (CEF), ceramidaaminoetilfosfonato (CAP), ceramidaetanolaminafosfato (CEF). (Van Vlieth y col., 1975, Cerbón y Flores, 1981). Siendo CEF (14%), FEA (16%) y CAP (17.5%) los más importantes (McLaughlin y Meerovitch, 1975). Las membranas de E. invadens presentaron CEP, CAP, EFM, componentes que están ausentes de las membranas de amibas de vida libre. El lípido CAP, resistente a la acción de las fosfolipasas y presente en alta concentración en las membranas de estas amibas sugiere un mecanismo de resistencia hacia sus propias enzimas y las del huésped. (Cerbón y Flores, 1981). Estudios de recambio de los lípidos de la membrana mostraron que la tasa de recambio fue específica para cada tipo de lípido. Por ejemplo, FI y CAP se recambiaron mostrando una vida media de 12h y FEA y CFI con una vida media de 24h, mientras que FC, EFM y FS no se recambiaron (Cerbón y Flores, 1981). Un hecho notable fue el descubrimiento de que la composición de lípidos de las membranas plasmática y fagolisosomales era diferente. Las membranas internas se encontraron enriquecidas en fosfolípidos (28%) contra 17% de la membrana plasmática. Las membranas

fagolisosomales presentaron mayor cantidad de FS, mientras que la plasmática presentó una mayor cantidad de EFM. La membrana plasmática presentó una relación de colesterol/fosfolípidos de 0.85-0.93, mientras que las membranas internas 1.05. La composición y porcentaje de colesterol y fosfolípidos dependió de la composición del medio de cultivo donde se desarrolló. La remoción del suero del medio provocó la duplicación de la concentración de CFI y decremento de EFM y CPE. Los fosfolípidos de la membrana son sintetizados por la propia amiba a partir de ácido oléico y linoléico, los que fueron esenciales para su supervivencia. La composición de fosfolípidos de la membrana reflejó la composición de ácidos grasos del medio (Van Vlieth y col, 1975). Las membranas de E. invadens no presentaron un marcador enzimático que copurificara durante el aislamiento. Pero una Na, K, Mg ATPasa (6.2x) y una fosfatasa ácida (8x) se enriquecieron levemente. (McLaughlin y Meerovitch, 1975, Van Vlieth y col, 1976). De la membrana plasmática se ha aislado una ATPasa Ca-dependiente (Zaraín y Arroyo, 1985). Las membranas internas copurificaron con una fosfatasa glicerol-fosfato dependiente (Van Vlieth y col, 1976). Las proteínas de las membranas de E. invadens se han analizado mediante PAGE, se encontró que variaron en peso molecular entre 10 y 70 KD, comparativamente menor en peso molecular y número a las halladas en E. histolytica. (McLaughlin y Meerovitch, 1975, Aley y col, 1980). Las membranas internas y externas de E. invadens difirieron en el número de proteínas observadas. Las membranas internas presentaron mayor número (16) que la membrana plasmática (10). (McLaughlin y Meerovitch, 1975). Las proteínas de la membrana plasmática presentaron alto grado de movilidad superficial, se redistribuyeron a un polo del trofozoíto al ligar anticuerpos antisuperficie, análogo al proceso de "capping".

observado en linfocitos (Calderon y Muñoz, 1980). Algunas hormonas lipídicas como por ejemplo los 3-ceto-~~A~~ esteroides y el dietilestilbestrol inhibieron marcadamente el crecimiento de E. invadens in vitro (Lesser, 1953). No se conoce si el sitio de acción de estos lípidos está asociado a la membrana

### 3) Genoma de E. invadens.

Hay pocos datos en relación a la composición del genoma de E. invadens. El DNA está contenido únicamente en el núcleo pero el RNA está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma. El contenido de DNA nuclear fue de  $3.2 \times 10^{-13}$ g para las cepas IP-1 y 165 y de  $3.7 \times 10^{-13}$ g por núcleo para la cepa PZ de E. invadens, el contenido de DNA nuclear siendo estimado mediante la reacción con difenilamina. (Gelderman y col, 1971). La temperatura media de desnaturalización del DNA fue de 80°C para la cepa IP-1 y 83°C para la cepa PZ y 165. El %G-C del DNA fue 26.1% para IP-1 y 33.4% para PZ señalando diferencias intraespecíficas. El DNA fue característicamente diferente y menor en %G-C,  $T_m$ , y secuencias repetidas medidas mediante reasociación, que el DNA de E. histolytica. (Gelderman y col, 1971b). Estudios de fragmentación del genoma de E. invadens y E. histolytica con la enzima de restricción Eco-R1 y la separación de los fragmentos digeridos por electroforesis en geles de agarosa revelaron diferencias específicas significativas entre sí y con respecto a otras especies de Entamoeba. El análisis de las secuencias repetidas del genoma reveló que al menos en parte este DNA amplificado fue ribosomal. (Bhualtacharya y col, 1988). Los sitios de síntesis y distribución del DNA se han revisado escasamente; Gosh (1969) demostró usando la técnica de tinción de Feulgen, que la síntesis y distribución de ácidos nucleicos en E. invadens fue similar a

la de E. histolytica. El núcleo de los trofozoítos fue Feulgen negativo en interfase y Feulgen positivo en la zona del endosoma en profase y anafase indicando que la distribución del DNA dependió de la fase del ciclo celular. La región del endosoma se consideró como un sitio de condensación del DNA nuclear previo a la división celular. (Pan y Geiman, 1955). El RNA en contraste adquirió posición periférica en la cromatina en comparación con la que se presenta en las células animales y una distribución citoplásmica asociada probablemente a los RNA mensajeros y ribosomales. (Gosh, 1969, Pan y Geiman, 1955).

#### 4) Respiración de E. invadens.

E. invadens es un organismo anaeróbico estricto y el oxígeno lo destruye en pocos minutos por efectos oxidantes sobre su metabolismo (Cheng, 1973, Gillin y Diamond, 1980). Su sensibilidad al oxígeno dependió de la temperatura, fue mayor para los trofozoítos a 24°C que a 0°C (Gillin y Diamond, 1980). Es posible que E. invadens pueda oxidar pequeñas cantidades de oxígeno como E. histolytica (Montalvo y col, 1971, Weinbach y col, 1974). Los trofozoítos degradan glucosa y almidón el cual en cultivos polixénicos promueve su crecimiento (McConnachie, 1955). El mecanismo de degradación de la glucosa en E. invadens no se conoce pero se sugiere que debe ser similar al de E. histolytica donde se ha estudiado con mayor detalle (McLaughlin y Aley, 1985, Reeves, 1974). E. invadens presenta una enzima sensible al oxígeno, la piruvato sintetasa (Lindmark, 1976), que es una enzima que descarboxila piruvato a AcetilCoA en presencia de aceptores de bajo potencial redox, que reciben los electrones del piruvato. Metilviológeno, FAD, FMN, ferredoxina fueron buenos aceptores. La enzima redujo el metronidazol lo cual es interesante porque podría reflejar parte del mecanismo amebicida de

este compuesto. Otras enzimas del metabolismo respiratorio que se encontraron presentes fueron la malato deshidrogenasa: ascarboxilante, oxaloacetato reductasa, alcohol deshidrogenasa y adenilato kinasa (Lindmark, 1976). Todas las enzimas se ubicaron en la fracción soluble del citoplasma. Los venenos de la respiración aerobia no tienen efecto sobre los trofozoítos ya que carecen de citocromos y mitocondrias. Sin embargo, el 2-4 DNP, un desacoplante de la oxidación y la fosforilación inhibe el transporte de metronidazol radioactivo al interior del trofozoíto impidiendo la reducción del metronidazol y aceptando electrones de un compuesto de bajo potencial redox (Müller, 1979). Se sugiere la existencia de un sistema de transporte de electrones o cadena respiratoria compuesta de proteínas de Fe-S similar a la presente en E. histolytica (McLaughlin & Aley, 1985).

#### 5) Temperatura óptima de crecimiento de E. invadens.

En contraste con E. histolytica que crece óptimamente a 37°C (Dobell, 1927, 1926, Diamond, 1968) el rango de temperatura de crecimiento de E. invadens fue de 20-27°C con un óptimo de 24°C. Tanto en medio polixénico como monoxénico (McConnachie, 1955). Estudios controlados en condiciones axénicas de la cepa 16502 de E. invadens precisaron los rangos de temperatura, creció en un rango entre 20-30°C con un óptimo de 24-27°C usando como criterio de supervivencia el crecimiento en agar (Gillín y Diamond, 1980). La temperatura letal mínima fue de 35.5°C y murió rápidamente a 42°C pero lentamente a 0°C. Se ha reportado una cepa adaptada a crecer a 37°C durante 190 subcultivos pero estos resultados no se han podido repetir por otros investigadores (Goordeva, 1966). E. invadens comparte requerimientos similares de temperatura con las cepas Laredo y Huff de E. histolytica.

6) Características del  
crecimiento de E. invadens.

E. invadens crece linealmente en cultivos monoxénicos y axénicos (Myer y Morgan, 1971, McConnachie, 1968). En contraste con E. histolytica que en las mismas condiciones crece de forma exponencial (Diamond y col, 1978). Las causas de esta diferencia no se conocen pero se ha sugerido que después de un ciclo de replicación en E. invadens solo un trofozoíto se divide subsecuentemente (Myer y Morgan, 1971). E. invadens incrementa su población a un límite máximo dependiente de la cantidad de nutrientes disponibles y permanece con una densidad estable hasta que el cultivo declina por lisis de los trofozoítos y escasez de nutrientes. E. invadens es muy resistente a la escasez de nutrientes en contraste con E. histolytica.

7) Hiperparasitismo en  
E. invadens.

Se ha reportado la existencia de hiperparásitos en E. invadens y E. histolytica. Bird y McCaul (1976) proporcionaron evidencia con el microscopio electrónico de la presencia de rhabdovirus citoplásmicos en E. invadens y E. histolytica. Los virus tuvieron medidas de 210x90 nm en promedio. Su número por célula fue de 50-100. No se conoce si estos virus dañan al trofozoíto o modifican su virulencia.

8) Huéspedes de E. invadens  
y patogenicidad.

E. invadens infecta gran cantidad de reptiles tanto en la naturaleza como en condiciones de cautiverio. Se ha reportado amibiasis en Varanus salvator, V. varius, Tiliqua sinoides, Pseudoboa clelia, Lampropeltis getulus, Agkistrodom mocosim, Natrix rombifer, N. sipedon, N. sipedon s., N. cyclopion, Experi-

mentalmente se ha infectado a lagartijas como Anguis fragilis, Lacerta mirabilis, L. agilis, Agama citricolis, a víboras como Natrix natrix helvetica, N. viperina, N. maura, Coluber constrictor, Thamnophis sirtalis, T. sauritus, Lampropeltis doliata, Storeria occipitomaculata, S. decalvi, Opheodrys vernalis, Diadophis punctatus, a tortugas como Chrysemis elegans, C. picta, Chelidra serpentina, Testudo tabulata, (Geiman y Ratcliffe, 1936, Neal, 1966). Es probable que la lista pueda ser agrandada conforme se realicen experimentos de infección con otras especies. Sin embargo otros reptiles son resistentes a su infección. Anolis carolinensis, Alligator mississippiensis, y Emys orbiculatus son ejemplos.

E. invadens no infectó ranas como Rana pipiens, Rana temporaria o peces como Carassius auratus, (McConnachie, 1955). Más recientemente se reportó que E. invadens causó amibiasis fulminante en el lagarto primitivo Sphenodon punctatus (La tuatara) y en las tortugas marinas Chelonyx mydas y Caretta caretta (Werner y col., 1976a, 1976b). Las serpientes venenosas Trimeresurus flavoviridis y del género Bothrops y Crotalus también fueron susceptibles (Ishii y col., 1981).

#### 9) Citotoxicidad y factores

#### de virulencia de E. invadens,

E. invadens causa amibiasis en varios reptiles pero es especialmente patógeno para las víboras (Cheng, 1973, Geiman y Ratcliffe, 1936, Hill y Neal, 1954). El parásito invade y destruye la pared intestinal de su huésped por mecanismos poco entendidos y se disemina a diversos órganos principalmente el hígado donde forma abscesos, causando más tarde la muerte de su huésped (Geiman y Ratcliffe, 1936, Barrow y Stockton, 1960). A diferencia de E. histolytica, se conocen mucho menos los factores de virulencia de E. invadens (Ravdin, 1982, Ravdin, 1985). Se sugiere por analogía que la adhe-

sión puede ser un factor de virulencia pero las lectinas que median esta adhesión y reconocen los residuos de carbohidratos sobre las células blanco no se conocen aún. En contraste en E. histolytica una lectina GalNac inhibible se identificó como principal mediadora de citotoxicidad y virulencia en el trofozoíto (Ravdin y col, 1985). E. invadens se adhiere a varios tipos de células. Enlaza eritrocitos humanos y de reptíl a 24°C pero se adhiere con mayor afinidad por estos últimos (Keller y col, 1988). La adhesión posiblemente sea influida por la temperatura y requiera de un citoesqueleto intacto como en E. histolytica. (Ravdin, 1982). La fagocitosis puede ser otro factor de virulencia de E. invadens puesto que es capaz de fagocitar varios tipos de células (McConnachie, 1955, Geiman y Ratcliffe 1936). Pero en contraste con E. histolytica la capacidad fagocítica es menor. Los trofozoítos de E. invadens presentan actividad citotóxica dependiente de contacto. Trofozoítos intactos indujeron la liberación de Cr<sup>51</sup> de las células hepáticas de la línea Chang in vitro (McCaul y col, 1978). En las condiciones de ensayo los sobrenadantes y homogenizados no fueron citotóxicos sugiriendo que se requirió la integridad estructural de las amibas para la expresión de la actividad. La citotoxicidad se inhibió cuando los trofozoítos se incubaron en condiciones hipotónicas previo al ensayo o por la adición de inhibidores específicos de fosfolipasas sugiriendo que una fosfolipasa participó en el mecanismo de citotoxicidad. Los homogenizados de E. invadens no tuvieron actividad lítica sobre los eritrocitos de reptíl en contraste con los de E. histolytica (Keller y col, 1988). Los resultados comparativos sugieren la existencia de actividades citotóxicas presentes en mayor cantidad o diferentes en E. histolytica. Los datos señalan sin embargo que los mecanismos citotóxicos de ambas amibas deben ser esencialmente similares. E. invadens al igual que E.

histolytica produce una proteína que forma poros en las membranas de las células animales pero su actividad fue menor (Yang y col, 1982, Keller y col, 1988). El papel de esta proteína en la virulencia de E. invadens y E. histolytica no es evidente ya que cepas de diferente virulencia tuvieron la misma actividad de amebaporo. Un factor adicional de virulencia de E. invadens pudiera ser la producción de enzimas proteolíticas. Los homogenizados de E. invadens y E. histolytica presentaron actividad proteolítica intensa en la fracción soluble activable por SDS y 2-mercaptoetanol. Las proteinasas fueron inhibidas por reactivos que atacaron grupos SH (Avila y col, 1985). Las enzimas proteolíticas pudieran ocasionar daño directo a las células o indirecto por la degradación de su entorno inmediato. La capacidad invasiva de E. invadens fue dependiente de la temperatura en condiciones de infección in vivo. La inoculación experimental de serpientes con trofozoítos a 34-37°C solo produjo infección transitoria mientras que las serpientes infectadas y mantenidas a 21-23°C desarrollaron amibiasis invasiva. (Barrow y Stockton, 1960, Meerovitch, 1960, 1961). Los datos sugieren que la invasividad dependió de la temperatura del huésped. Los hábitos alimentarios pueden influir en la patogenicidad de E. invadens. En la tortuga C. picta, su huésped natural, que consume vegetales y por tanto gran cantidad de carbohidratos E. invadens es comensal (Meerovitch, 1958), en tanto que en las víboras que habitualmente son carnívoras usualmente desarrolla una amibiasis fatal. Las bacterias modifican la virulencia de E. invadens y E. histolytica. En general las cepas con la flora indígena asociada son más virulentas que las mantenidas en condiciones monoxénicas o axénicas. El papel de las bacterias no se ha dilucidado aún.

10) Estructura antigénica de los  
trofozoitos y respuesta inmune  
en la amibiasis producida por  
E. invadens.

E. invadens produce una respuesta inmune humoral cuando se inyecta en conejos (McLaughlin y Meerovitch, 1975, Krupp, 1966) lo que ha permitido analizar las fracciones celulares donde los antígenos se ubican. Usando la técnica de inmunoelectroforesis se compararon la antigenicidad de la membrana plasmática, vesículas intracelulares y fracción soluble del trofozoito. Se encontró que todas las fracciones presentaron antígenos pero diferentes grados de antigenicidad. Los antígenos de E. invadens se localizaron predominantemente en una fracción vesiculada citoplásmica mientras la membrana plasmática presentó menos antígenos (McLaughlin y Meerovitch, 1975c). Los antígenos de E. invadens son predominantemente proteínas. Durante la infección producida por el trofozoito en sus huéspedes reptiles probablemente induce una respuesta inmune humoral y celular cuando invade la mucosa intestinal y se disemina. Sin embargo, no hay datos del tipo de anticuerpos o estudios de la respuesta celular en sus huéspedes naturales. E. invadens y E. histolytica presentan antígenos comunes pero también gran cantidad de antígenos diferentes. Usando como antígenos lisados de cultivo de E. invadens en asociación con Clostridium welchii se observó utilizando la técnica de inmunoelectroforésis que el antisuero anti-E. invadens reaccionó con dos antígenos de E. histolytica (Krupp, 1965). La cepa de E. histolytica Huff que crece a temperatura ambiente interesantemente compartió gran similitud antigénica con E. invadens. presentando 5 antígenos comunes (Krupp, 1965). La membrana de E. invadens y E. histolytica es probablemente el primer blanco de los anticuerpos circulantes

por lo que su antigenicidad se ha estudiado en detalle. E. invadens presenta antígenos superficiales como lo demuestra la reacción de redistribución de antígenos de su membrana cuando anticuerpos anti-E. invadens se unen a su superficie (Calderon y Muñoz, 1980). Mediante técnicas de radioyodación superficial y enlace con Concanavalina A se aislaron antígenos de superficie de E. invadens, la mayoría fueron glucoproteínas de 14, 18, 24, 43, 60 y 67Kd de peso molecular siendo predominante el de 67KD. (Muñoz y col, 1979, Acosta-Valle y col, 1978). El enlace de antígenos de superficie por anticuerpos induce su modulación (Calderon y Muñoz, 1980). Este fenómeno poco estudiado pudiera ser en parte responsable de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del huésped.

#### 11) Isoenzimas de E. invadens.

Con objeto de evaluar la variabilidad genética de diferentes cepas dentro del género Entamoeba, así como para hacer estudios comparativos del patrón de isoenzimas de diferentes especies y para asociar patrones específicos con la virulencia particular de cada cepa, se han estudiado las isoenzimas de Entamoeba. Mediante electroforesis en acetato de celulosa se encontró que E. invadens presentó una banda de actividad de glucokinasa que migró más lentamente que las 2 isoenzimas correspondientes de E. histolytica, sirviendo esto para diferenciar ambos organismos (Reeves y col, 1967). Las isoenzimas de glucokinasa EC2711, glucosa fosfato isomerasa, EC5319, fosfoglucomutasa, EC2751, malato deshidrogenasa descarboxilante EC11140 y NADP diáforasa, fueron analizadas con objeto de hacer un estudio comparativo de Entamoeba (Reeves y Bishop, 1968). Los resultados mostraron gran similitud entre E. invadens y E. terrapinae. Sargeant y Williams (1980), usando electroforesis en geles de almidón para separar las iso-

enzimas confirmó las observaciones hechas para los patrones de las enzimas glucosafosfato isomerasa, fosfoglucomutasa y malato deshidrogenasa. Sin embargo, encontraron diferencias intraespecíficas entre cepas diferentes de E. invadens. Las cepas BAH y PZ presentaron diferencias en la migración al ánodo de la fosfoglucomutasa. En sus ensayos la malato deshidrogenasa de ambas cepas tuvo dos isoenzimas, mientras que la glucosa fosfato isomerasa y fosfoglucomutasa solo una (Sargeant y Williams, 1980). En ninguno de los estudios se intentó asociar el patrón isoenzimático con la virulencia como se ha hecho para E. histolytica (Sargeant y col, 1978). Mediante filtración en gel en los extractos de trofozoítos de E. histolytica se han detectado dos isoenzimas de la alcohol deshidrogenasa, cuatro de la fosfatasa ácida, seis de la esterasa, seis de la amilasa y dos de la glucosidasa (Müller y col, 1988) sí hay isoenzimas de estas enzimas en E. invadens queda por ser investigado.

### C. Biología de los quistes

#### de Entamoeba.

##### 1) Generalidades.

Los quistes de Entamoeba son de extraordinaria importancia para el parásito ya que permiten su diseminación hacia otro huésped por ser estructuras de gran resistencia que mantienen la viabilidad del parásito en un medio adverso (Kudo, 1960, Cheng, 1973, McConnachie, 1969). Comparativamente con los estudios acerca de los trofozoítos los quistes son mucho menos conocidos en vista de la dificultad experimental de obtener cantidades adecuadas para realizar estudios en ellos. El objetivo de los párrafos siguientes será analizar los datos que se conocen de la biología de los quistes. En vista de la escasez de datos se hará referencia a los trabajos

efectuados en diferentes especies de Entamoeba pero haciendo énfasis en E. invadens.

## 2) Morfología y ultraestructura

Los quistes de E. invadens tienen un diámetro de 11-20  $\mu\text{m}$  con un promedio de 13.8  $\mu\text{m}$ . Son mayores que los quistes de E. histolytica que tienen un diámetro de 12  $\mu\text{m}$  (McConnachie, 1969). Tienen una forma esférica y están rodeados de una pared celular. Los núcleos son idénticos a los del trofozoíto. Presentan una vacuola de glucógeno que ocupa gran parte del citoplasma a menudo empujando a los núcleos del quiste hacia la periferia (McConnachie, 1969, Kudo, 1960, Cheng, 1973). Presentan en el citoplasma estructuras características llamadas cuerpos cromatoides que son barras de ribonucleoproteínas con afinidad por los colorantes básicos. En E. invadens los cromatoides varían de forma de palillo a masas irregulares o de forma aciculada (Geiman & Ratcliffe, 1936). Usando el microscopio electrónico se ha estudiado la ultraestructura de los quistes de E. invadens y E. histolytica (Chavez y col, 1978, Proctor & Gregory, 1973). Los quistes de E. invadens presentaron las mismas estructuras vistas al microscopio electrónico que los trofozoítos por lo que no se discutirán en detalle. Distintivamente en los quistes se observan en el citoplasma agregados cristalinos de miles de ribosomas dispuestos en forma helicoidal sobre haces de filamentos paralelos que son los cuerpos ribonucleoproteicos con dimensiones de 8x3x3  $\mu\text{m}$ . Otra característica distintiva fue la presencia de vacuolas citoplásmicas con gránulos electrodensos en el citoplasma. Los quistes acumularon masas granulares de glucógeno. Dependiendo del grado de maduración se observaron 1-4 núcleos de menor tamaño que en el trofozoíto (Chavez y col, 1978). Al microscopio electrónico la pared celular se

observa como una malla fibrilar de 100-400nm situada en estrecha unión con la membrana plasmática, con 2 o 3 capas distinguibles. En el quiste la membrana plasmática presentó invaginaciones profundas de la superficie al interior citoplásmico. (Chavez y col, 1978). Los quistes de E. histolytica fueron similares pero las vacuolas con gránulos electrodensos fueron más escasas. El grosor de la pared del quiste de E. histolytica fue de 125-150nm. Una distinción importante entre los quistes de E. invadens y E. histolytica y los trofozoítos fue que presentaron los primeros menor número de vacuolas. (Chavez y col, 1978). En un estudio de microscopía electrónica mediante la técnica de criofractura aplicada a la membrana de trofozoítos y quistes de E. histolytica, Yoshikawa y col, (1988), se encontró que las partículas intramembranales fueron más escasas en los quistes que en los trofozoítos. En los trofozoítos las partículas intramembranales tuvieron una densidad de  $1139 \pm 105/\mu\text{m}^2$  en la cara citoplásmica y una densidad de  $9/\mu\text{m}^2$  en la cara externa. En contraste en el quiste la densidad de partículas intramembranales fue de  $6 \pm 2/\mu\text{m}^2$  en la cara citoplásmica y menos de  $1/\mu\text{m}^2$  en la cara externa. Las partículas intramembranales probablemente fueron proteínas integrales cuya síntesis se reprimió en el quiste. La ultraestructura de los quistes se ha observado en condiciones en las que se han administrado metronidazol y los inhibidores de la síntesis de proteínas rifampicina y emetina en dosis subletales. El tinidazol y la rifampicina indujeron la aparición de vacuolas con elementos membranosos en su interior y vesículas llenas de material amorfo electrodense, algunas de ellas ubicadas próximas a la membrana plasmática. La emetina indujo la aparición de vesículas y cisternas aplanadas en 22h de incubación (Mora Galindo y col, 1986). Como en el caso de otros inhibidores la emetina también indujo la

aparición de vacuolas electrodensas próximas a la membrana plasmática. La emetina y tipidazol provocaron el desarreglo de la estructura fibrilar de la pared, pérdida de su grosor y desprendimiento de la membrana del quiste. (Mora Galindo y col, 1986). Estos datos sugieren que los fármacos interfirieron el proceso de biosíntesis y exportación de la pared de los quistes.

### 3) Los cuerpos cromatoides de E. invadens.

Debido a la complejidad estructural e importancia fisiológica de los quistes muchos investigadores del género Entamoeba se han interesado en el estudio de los cuerpos cromatoides. Enseguida precisaremos datos sobre la ultraestructura y composición de éstos. Inicialmente los cuerpos cromatoides se designaron como elementos para servir al quiste como depósito y almacenamiento de proteínas (McConnachie, 1969, Barker y Deutch, 1958). La demostración citoquímica de la presencia de RNA y proteínas en los cuerpos cromatoides sugirió un papel más importante. Hasta la utilización del microscopio electrónico no se logró precisar la estructura de los cuerpos cromatoides. Las micrografías sugirieron una estructura cristalina con masas de partículas pequeñas, las cuales se pensaron eran virus cristalinos. Barker & Deutch en 1958 describieron mediante estudios de microscopía electrónica que los cuerpos cromatoides estuvieron constituidos por ribosomas ordenados en forma cristalina (Barker & Deutch, 1958, Sidiqi & Rudzinska, 1965). Encontraron, por medio de micrografías, que tuvieron una dimensión de  $1 \times 0.5 \times 2.9 \times 7 \mu\text{m}$ . Los cuerpos cromatoides estaban compuestos por arreglos paralelos de 9-34 láminas con ancho individual de lámina de 250-350 Å y una distancia intralaminar de 100-150 Å. Describieron una

disposición helicoidal de los ribosomas en cada laminilla. Morgan y col (1965, 1967, 1968) mostraron que los cuerpos cromatoides tuvieron dimensiones de  $3 \times 3 \times 8 \mu\text{m}$ . Observaron un arreglo hexagonal de las hélices de ribonucleoproteína. Mediante la técnica de difracción óptica determinaron los parámetros de la hélice y pudieron dilucidar la disposición de los ribosomas en la hélice. La hélice está constituida por dos cadenas opuestas cada una consistente de 6 ribosomas por vuelta. Una cadena se superpone a la otra mediante rotación de  $150^\circ$  y translocación de  $75 \text{ \AA}$  sobre y a lo largo del eje de la hélice. Los ribosomas de  $180 \text{ \AA}$  de diámetro entran en contacto unos con otros (Morgan y Uzman, 1967). Una descripción detallada de la disposición de los ribosomas en la hélice y los ángulos y distancias entre ribosomas contiguos es dado por Morgan (1965, 1967, 1968). Lake y Slater (1972), hicieron una reconstrucción tridimensional de la hélice del cuerpo cromatoide de E. invadens a partir de micrografías electrónicas de secciones. Encontraron que la unidad de la hélice, el ribosoma o un precursor de éste, contuvo 3 regiones de densidad definida. La región más grande de densidad llamada L se localizó cerca de la periferia de la hélice de forma circular. Midió  $220 \text{ \AA}$  axialmente,  $150 \text{ \AA}$  radialmente y  $250 \text{ \AA}$  tangencialmente con un volumen de  $4.9 \times 10^6 \text{ \AA}^3$ . La región mayor adyacente denominada subunidad S se enlazó con la subunidad L axialmente y tuvo una anchura máxima perpendicular al eje mayor de  $160 \text{ \AA}$  y una mínima de  $80 \text{ \AA}$ . El volumen de la subunidad S fue de  $2.9 \times 10^6 \text{ \AA}^3$ . Finalmente y para su sorpresa demostraron la presencia de una partícula adicional que denominaron partícula X. La partícula tuvo un volumen de  $0.9 \times 10^6 \text{ \AA}^3$ . Las partículas L y S pueden equipararse a las subunidades mayor y menor de los ribosomas mientras la partícula X tiene una función no descrita aún (Lake y Slater, 1972). Los cuerpos cromatoides de E. invadens presentaron un alto contenido de

triptofano. Cada quiste presentó un contenido de  $4 \times 10^{-5} \text{g}$  de este aminoácido. Probablemente el triptofano estuvo asociado a los cromatoides y ribosomas formando cristales (Morgan y col, 1974). Las proteínas ribosomales de animales tuvieron 1% de triptofano mientras que los cuerpos cromatoides tuvieron 33%. Czeto y col (1973), mediante el uso de microespectrofotometría aplicada a soluciones de quistes en el rango de 240-360nm encontraron que los cuerpos cromatoides de los quistes de E. invadens presentaron un espectro de absorción a 275nm análogo a la curva de absorción obtenida por soluciones de triptofano adicionados de ribosomas de embrión de trigo. Quistes expuestos al aire y analizados 24h después presentaron espectros de absorción a 260 y 310 nm similares a los obtenidos por soluciones de formilkinureína y ribosomas. A los 3 días de exposición al aire los quistes mostraron espectros de absorción comparables a los obtenidos de ribosomas de embrión de trigo, kinureína y ribonucleasa in vitro. Los datos en opinión de Czeto y col. sugirieron que los quistes presentaron triptofano asociado a los cuerpos cromatoides. El triptofano se degradó por su exposición al aire formando compuestos de oxidación kinureína y formilkinureína. Los datos de titulación óptica sugirieron que los cromatoides presentaron 30% de triptofano y 60% de ribosomas. Estudios del análisis del contenido de Zn de los quistes de E. invadens mediante espectrofotometría de absorción atómica, análisis de la señal de Zn a los rayos X y tinción con ditizona mostraron que los quistes de E. invadens presentaron dentro de los cromatoides  $1 \mu\text{g}$  de Zn por quiste, concentración muy elevada para una estructura celular. (Morgan & Satillaro, 1972). El Zn se acumuló del medio de cultivo en los cromatoides  $10^5$  veces. Morgan y Satillaro calcularon que el número de átomos de Zn fue igual al número

de ribonucleotidos del RNA ribosomal presente en los cuerpos cromatoides sugiriendo que su papel in vivo fue neutralizar la carga de los ribonucleotidos y contribuir a la estructura cristalina de los cuerpos cromatoides e impedir la destrucción por ribonucleasas intracelulares.

Los cuerpos ribonucleoproteicos estan presentes en los trofozoítos también pero el grado de agregación y la cantidad de cuerpos ribonucleoproteicos dependió del estadio de crecimiento de la amiba y el tipo de medio en que se encontraba. Los cuerpos cromatoides parecen tener un ensamblaje citoplásmico. La observación de hélices de ribosomas libres sugirieron un ensamblaje citoplásmico. Kress y col (1971) intentaron mediante microscopía electrónica y autorradiografía investigar los sitios citoplásmicos de ensamblado. Estos autores mostraron una relación entre filamentos citoplásmicos y ribonucleoproteínas y la existencia de sitios citoplásmicos específicos de formación de cuerpos ribonucleoproteicos. Trofozoítos tratados con vinblastina  $5.4 \times 10^{-4} M$  presentaron masas de cuerpos ribonucleoproteicos en 6 h. El estudio de la secuencia de eventos ocurridos por el tratamiento anterior ayudó a dilucidar los eventos tempranos de formación de cuerpos ribonucleoproteicos. En áreas libres de glucógeno con ribosomas dispersos y material amorfo opaco a los electrones se formaron polisomas pero no cuerpos ribonucleoproteicos en un período comprendido entre 30 min. y 3 horas. En 3-6 horas aparecieron más zonas libres de glucógeno con ribosomas libres y filamentos. Algunas zonas presentaron filamentos citoplásmicos empacados densamente. Otras zonas se observaron con hélices de ribonucleoproteínas apiladas y esparciadas entre filamentos, polisomas y ribosomas libres (Kress y col. (1971)). Estos datos sugieren una secuencia compleja de eventos que originan la formación de los cuerpos ribonucleoproteicos. Debe haber una interacción coordinada entre el citoesqueleto y

los ribosomas en el trofozoíto. Los cuerpos cromatoides son escasos en los trofozoítos en crecimiento activo en medio axéi en contraste con su presencia en mayor número en los trofozoítos en fase estacionaria o crecidos en cultivo polixénico lo que señala una relación entre el estado nutricional y su formación (McConnachie, 1969, Rossenbaum & Wittner, 1970). Los cuerpos ribonucleoproteicos pueden inducirse también por medios distintos a los químicos como lo es el choque osmótico. Se ha sugerido que el proceso de desensamblaje y disgregación de las hélices de ribonucleoproteína debe ser el proceso inverso de su formación, lo que ocurre sobre todo durante el desenquistamiento. Los datos sugieren que la formación de hélices de ribonucleoproteínas dependen de factores no descritos en detalle aún. Uno de los objetivos para los investigadores que estudian la fisiología de Entamoeba debería ser el conseguir la cristalización y formación de cuerpos ribonucleoproteicos a partir de componentes aislados. La cristalización in vitro permitiría la realización de análisis de difracción de rayos X lo cual haría posible hacer mapas precisos de las proteínas ribosomales en las subunidades, objetivo no logrado aún en ningún organismo.

#### 4) Variaciones en el tamaño de

##### los quistes de Entamoeba.

En E. invadens los quistes presentan variación en su tamaño dependiendo de las condiciones del medio en el que se obtienen y la flora bacteriana asociada, pero caen en rangos suficientemente específicos para caracterizar una especie (Geiman & Rattcliffe, 1936, McConnachie, 1955, 1969). En E. histolytica sin embargo existen al menos dos razas que difieren estadísticamente en el tamaño de sus quistes (Sappero y col. 1942). E. hartmanni y E. histolytica se designaron como razas de una misma especie produciendo

quistes pequeños y grandes respectivamente. Sin embargo en la actualidad se consideran dos especies diferentes basados en criterios fisiológicos y diferencias morfológicas. La raza de quistes pequeños es menos patógena que la de quistes grandes (McConnachie, 1969).

5) Biosíntesis estructura  
y composición de la pared celular  
de los quistes de E. invadens.

La pared celular de los quistes de Entamoeba es una estructura que rodea a los quistes y esta estrechamente asociada con la membrana celular. Al microscopio óptico se observa como una película de alta refringencia que rodea al quiste. Los quistes son extremadamente adhesivos entre sí y forman racimos cuando se obtienen de cultivo. La pared celular de los quistes de E. invadens fue más gruesa que la de los quistes de E. histolytica y presentó mayor número de capas fibrilares (McConnachie, 1969, Chavez y col, 1978). Mediante microscopía electrónica de barrido se ha observado la presencia de un poro en la superficie de la pared celular probablemente sitio especializado por el cual el trofozoíto escapa del quiste (Morales-Vallarta y col, 1989). La pared celular de los quistes es relativamente rígida y retiene su forma después que la amiba ha escapado. La pared celular de E. histolytica y E. invadens es permeable por lo que los quistes son susceptibles a la desecación. Quistes secos y vueltos a hidratar fueron incapaces de eclosionar (Reardon y col. 1952). Pruebas citoquímicas realizadas en quistes de E. histolytica demostraron la presencia de proteínas en la pared celular, sin embargo, fue resistente a pancreatina, tripsina y pepsina. Es de interés notar que la pepsina hizo un hoyo en la pared de los quistes indicando zonas de fragilidad asociadas con proteínas (Kofoid, 1931). La pared celular de los quistes fue insoluble en agua pero soluble en la

presencia de ácidos fuertes. Arroyo y col. (1980) demostraron que el componente principal de la pared de los quistes fue el polisacárido aminado quitina. Quistes tratados con HCl 6N durante varias horas liberaron 25% de aminoazúcares, 2% de azúcares neutros y 0.08% de ácidos urónicos. Evidencia adicional se obtuvo al someter las paredes purificadas con HCl 1N/NaOH 1N, al análisis de difracción de rayos X. El patrón de difracción obtenido fue característico de quitina (Arroyo y col, 1980). La pared celular aislada y en el quiste intacto enlazó Calcofluor M2r un colorante fluorescente específico para quitina y otros  $\beta$ -polisacáridos. El colorante dió lugar a una fluorescencia azul de la pared del quiste en un fondo oscuro visto al microscopio de fluorescencia (Ramírez Rojas y col. 1980, Arroyo y col, 1978). Estudios de microscopía electrónica de la pared de los quistes tratados con álcali concentrado a 120°C durante 60 minutos revelaron que la pared de los quistes presentó diferenciación regional. El lado interno de la pared fue irregular con algunas fibrillas mientras que el externo fue más uniforme con una densa estructura microfibrilar con arreglo aleatorio interlazado (Arroyo y col, 1980). Estos mismos autores en el 1982 demostraron los sitios de ubicación de la quitina en la pared celular de los quistes usando la aglutinina de germen de trigo (AGT) unida a oro coloidal como rastreador de la quitina. Los quistes se tiñeron rojo vino mientras que los trofozoítos no. La observación al microscopio electrónico de los sitios de deposición de la AGT-oro coloidal mostró que las partículas se enlazaron directamente sobre la superficie de la pared y en la matriz de la pared celular en secciones transversales de la pared indicando una distribución de las fibras de quitina en todo el espesor de ésta. Los inhibidores de la síntesis de quitina polioxina D y nikomicina 50  $\mu$ g/ml inhibieron la síntesis de quitina y la formación de la pared ce-

lular en quistes en proceso de enquistamiento así como también se inhibió la incorporación del precursor NacGlu radioactivo (Avron y col, 1982). De igual manera el Calcofluor M2r 0.05% inhibió la síntesis de quitina y la formación de la pared celular en trofozoítos en proceso de enquistamiento y la incorporación de NacGlu radioactiva (Arroyo y col, 1982). Estos fármacos posiblemente interfirieron con la formación de quitina recién sintetizada. Pocos datos se conocen acerca del mecanismo de biosíntesis de quitina en E. invadens. Ramírez Rojas y col (1982) midieron la actividad de quitina sintetasa en los quistes de E. invadens en proceso de enquistamiento. Sin embargo la presencia de quitinasa en los extractos impidió una medición eficiente de la incorporación de UDP-NacGlu radioactiva a la quitina. Usando quitina sintetizada por Neurospora crassa marcada radioactivamente como substrato los extractos de E. invadens (100 µl, 0.8-1mg proteína) degradaron 67% de la quitina en 12 h de incubación. Intentos de medir la actividad de quitina sintetasa por incorporación de NacGlu radioactiva en oligosacaridos de quitina como quitobiosa no dieron resultado ya que la tasa de incorporación de quitina fue baja y muy variable indicando que la medición de la actividad de la enzima no fue eficiente. Notablemente en este sistema de ensayo los trofozoítos no presentaron actividad de quitinasa siendo ésta una actividad exclusiva de los quistes. Los resultados indican la complejidad del problema de medir la síntesis de quitina. La purificación y liberación de compuestos inhibitorios de la enzima o el desarrollo de sistemas de ensayo diferentes se perfilan como estudios obvios para resolver el problema. Los procesos subsecuentes a la síntesis de quitina, la incorporación de glucoproteínas y otros componentes de la pared y los medios de su transporte externo son procesos poco conocidos.

Mediante tinción con Calcofluor M2r de los cultivos enquistantes se ha observado la presencia de paredes celulares anormales en trofozoítos en proceso de enquistamiento las cuales tenían forma de saco irregular, Calcofluor positivo. En opinión de Ramírez y col(1980) la formación de estas paredes celulares anormales puede deberse a que en algunos trofozoítos el estímulo de enquistamiento no coincide con una etapa apropiada del ciclo celular e inician la síntesis de la pared desordenadamente. Sintetizan pared celular aún cuando el trofozoíto es móvil pero debido a esta motilidad la pared se distorsiona.

6) Variaciones bioquímicas en el enquistamiento de Entamoeba.

Durante la diferenciación de Entamoeba hay expresión de genes no activos en el trofozoíto. Solo recientemente se ha comenzado a explorar las variaciones asociadas con la transformación de trofozoíto a quiste, las cuales deben ser muy importantes ya que el paso de un trofozoíto que es muy activo metabólicamente a un quiste que metabólicamente está en reposo debe acompañarse de modificaciones metabólicas importantes. Avron y col(1986), y Chayen y col(1985), mostraron la presencia de glicoproteínas específicas de los quistes las cuales no están presentes en los trofozoítos. Las glicoproteínas estadio específicas tuvieron afinidad por la aglutinina de germen de trigo y tuvieron pesos moleculares de 250, 105, 95Kd. Las glicoproteínas de 205 y 105Kd tuvieron ácido siálico en su estructura como se demostró mediante su aislamiento y caracterización (Avron y col, 1986). Ya que el ácido siálico está ausente de los trofozoítos estas glicoproteínas son fuertes candidatos como marcadores del enquistamiento. Chayen y col (1988). Demostraron que E. histolytica crecida en medio monoxénico de Jones

sujeta a enquistamiento produjo quistes que enlazaron la lectina específica para ácido siálico de Lirios poliphemus. Las variaciones bioquímicas asociadas incluyeron la aparición también de dos glicoproteínas con ácido siálico de 100 y 150Kd ausentes en los trofozoítos indicando que las glucoproteínas con ácido siálico son importantes para el enquistamiento en Entamoeba. (Chayen y col, 1988). Que estas glucoproteínas son específicas de quistes es reforzado por el hecho de que anticuerpos monoclonales producidos contra las sialoglicoproteínas de E. invadens tuvieron exclusivamente a los quistes. E. invadens no sintetizó ácido siálico y lo incorporó de las proteínas del suero indicando que las glicoproteínas con ácido siálico del huésped pueden ser degradadas y reprocesadas por el parásito. No es claro aún si las glicoproteínas ácido siálico específicas se localizan en la pared celular o en la membrana celular del quiste. Se ha sugerido que el papel biológico funcional de estas proteínas de los quistes sería el siguiente: La carga negativa de los ácidos siálicos podría ayudar a los quistes formados a liberarse de la pared intestinal y protegerlos del sistema inmune y actividad proteolítica de las heces (Chayen y col, 1988).

7) Síntesis de DNA, transcripción y traducción durante el enquistamiento en Entamoeba.

Sirijantakarn y col (1980) estudiaron cuantitativamente mediante experimentos de incorporación de timidina- $H^3$  las variaciones del DNA de los trofozoítos en proceso de enquistamiento. Mostraron que los trofozoítos transferidos a medio de enquistamiento axénico incorporaron timidina hasta la formación de la pared celular del quiste (30h) decayendo después marcadamente sugiriendo que la síntesis de DNA y la pared celular fueron eventos simultáneos. La síntesis del DNA concluyó antes de la ocurrencia de las

divisiones celulares que suceden en la maduración del quiste. También midieron el contenido de DNA de las células en diferentes fases del enquistamiento, a las 12 h de transferencia al medio de enquistamiento encontraron un valor promedio de 0.151pg/célula, en la fase de prequistes a las 24 h encontraron un valor de 0.108pg/célula, a las 30 h etapa de quistes inmaduros encontraron un valor de 0.119pg/célula y a las 48 h etapa de quiste maduro un valor de 0.155pg/célula. En opinión del autor anterior los datos de los valores del DNA encontrados fueron compatibles con la idea de que los trofozoítos que enquistaron estuvieron en la fase G2 de su ciclo celular y con un complemento genético haploide sugiriendo que durante el proceso de enquistamiento ocurrió una división celular y síntesis de DNA antes de la división de los núcleos en los quistes en maduración. Con objeto de saber si ocurrieron o no divisiones celulares antes de enquistarse los trofozoítos se marcaron radioactivamente con timidina- $H^3$  en el medio de crecimiento y se transfirieron a medio de enquistamiento. En los quistes cosechados se midió la radioactividad residual. Los datos indicaron que más del 50% de la marca se perdió indicando la ocurrencia de al menos una división celular.

La síntesis de proteínas disminuye durante el enquistamiento, como lo demuestra la incorporación de aminoácidos radioactivos en los trofozoítos enquistantes (Kumsamrarn y col, 1975). La formación masiva de ribosomas cristalizados en los cuerpos cromatoides sugiere que en los quistes los ribosomas en su mayoría no son activos en la traducción (Kumsamrarn y col, 1975, Barker y Swales, 1972). La traducción de los ribosomas en los quistes medida mediante la incorporación de fenilalanina fue anormal. Los ribosomas aislados de los cuerpos cromatoides de los quistes fueron menos eficientes

que los ribosomas aislados de los trofozoítos en la traducción de polifenilalanina en las mismas condiciones (Kumsamrarn y col, 1975b). La adición de una fracción de sobrenadante de los trofozoítos sin embargo restituyó su capacidad de traducción a niveles normales sugiriendo que en los quistes existieron factores inhibitorios o que los factores que participan en la traducción se encontraron en condiciones subóptimas o aún ausentes. Una pregunta muy importante es si los ribosomas de los cuerpos cromatóides de los quistes y los trofozoítos difieren en su composición. Estudios de sedimentación sugieren resultados conflictivos. Barker y col (1972) encontraron que los ribosomas de los quistes presentaron patrones de sedimentación diferentes del de los ribosomas de trofozoítos. Kumsamrarn y col (1975) por el contrario encontraron patrones de sedimentación similares de los ribosomas de trofozoítos y quistes, aunque en la actualidad se conoce en detalle la composición de las proteínas ribosomales de E. invadens y E. histolytica (Price y col. 1983, Vargas y col, 1986) aún no se han aplicado las técnicas disponibles para evaluar la hipótesis de diferencias de composición de las proteínas ribosomales de trofozoítos y quistes. Una inhibición de la transcripción puede estar asociada con el enquistamiento. Inhibidores de la transcripción como Actinomicina D (100 µg/ml), NaF 50 mM, que inhibieron la incorporación de uracilo radioactivo y también inhibidores de la síntesis de proteínas puromicina 50 µg/ml y cicloheximida 100 µg/ml, indujeron la agregación de los ribosomas en las hélices de ribonucleoproteínas sugiriendo que la ausencia de RNA mensajero disponible para ser traducido provoca que los ribosomas se agrupen y formen cuerpos ribonucleoproteicos como en los quistes (Kumsamrarn, 1975a). La remoción de los inhibidores y la transferencia a medio fresco provocó la desaparición

de las hélices de ribonucleoproteína en los trofozoítos que se habían formado sugiriendo que la reversión de la inhibición provocó la desaglutinación de los ribosomas. En opinión del autor anterior el proceso de acumulación de ribonucleoproteínas debe suceder en condiciones naturales durante el proceso de enquistamiento y probablemente refleje aspectos iniciales del proceso. Un aspecto de interés que probablemente es único en Entamoeba es que el proceso de polimerización de las ribonucleoproteínas no requirió energía y ocurrió espontáneamente en condiciones en las que la síntesis de energía estuvo bloqueada. No requirió la transcripción o traducción de una proteína especial lo que indicaría que los componentes de las hélices de ribonucleoproteína están en el citoplasma en espera de una señal apropiada (Kusamrarn y col, 1975). La composición de bases del RNA ribosomal de los quistes de E. invadens es diferente de la composición del RNA ribosomal de los trofozoítos presentando un mayor contenido de G+C (Barker & Swales, 1972). Durante el enquistamiento también hay modificaciones en el tipo de isoaceptores de los RNA de transferencia. Los RNAt de lisina aislados de los trofozoítos fueron 6 mientras en los quistes se hallaron solo 5 y variaron en su concentración. (Hernández y col, 1986). En opinión del autor mencionado la variación en la concentración de especies de RNAt se relaciona con algún aspecto de la diferenciación de los trofozoítos a quistes. Es posible que exista una relación estrecha entre los factores que regulan la síntesis de ribosomas en los trofozoítos y el proceso de enquistamiento. Los ribosomas sintetizados citoplásmicamente se integran en los cuerpos cromatoides como lo demuestra el seguimiento autorradiográfico de los ribosomas marcados (Kusamrarn, 1975) y col, 1975b). Los ribosomas son sintetizados en grandes cantidades en

períodos de crecimiento activo y se aglutinan en las hélices durante el enquistamiento. En opinión de Barker (1964, 1972), la formación de cuerpos cromatoides es un mecanismo adaptativo del parásito. Los ribosomas se sintetizan en cantidades elevadas bajo condiciones de crecimiento favorables y se cristalizan durante el enquistamiento, se almacenan como ribosomas intactos en los quistes y se distribuyen entre las amibas metaquísticas como ribosomas listos para utilizarse en el período de establecimiento en el nuevo huésped.

#### 8) Enquistamiento y división celular.

Barker y Svila (1964) mostraron usando el microscopio de luz ultravioleta que durante la formación de los quistes de Entamoeba hubo una división diferencial del trofozoíto en proceso de enquistamiento. Esta división diferencial produjo una célula más pequeña que acumuló los ribosomas y un trofozoíto. La célula prediferenciada continuó la diferenciación hasta convertirse en quiste. La división nuclear que se produce durante la maduración de los quistes para formar una célula tetranucleada es idéntica a la que se da en el trofozoíto en el aspecto ultraestructural como se demostró en E. invadens. (Morales-Vallarta y col (1982).

#### 9) Métodos de inducción del enquistamiento en Entamoeba.

La producción de quistes en cultivos de Entamoeba ha sido difícil y las condiciones que inducen la formación no se comprenden aún. Dobell en 1928 señaló que la presencia de los quistes en los cultivos mixtos fue rara o ausente pero en presencia de un crecimiento activo de los trofozoítos de E. histolytica la adición de almidón y su remoción del cultivo pudo inducir irregularmente la aparición de quistes en el cultivo (Dobell, 1928).

Varios investigadores posteriormente confirmaron estas observaciones y usaron métodos similares para inducir el enquistamiento basados en la presencia bacterias asociadas y la remoción de almidón del medio (McConnachie, 1969, Balamuth, 1962). La utilización de medios polixénicos no aclararon sin embargo los factores responsables de la capacidad de diferenciarse. Recientemente con el desarrollo de los medios de crecimiento axénicos los factores responsables pueden ser identificados con mayor precisión. Los trofozoítos de E. invadens y E. histolytica no enquistaron cuando crecieron en medio TYI-S-33 o TPS-1 y al llegar a la fase de declive de la población los trofozoítos se lisaron. (Diamond, 1968, Diamond y col, 1978). El enquistamiento ocurrió en cultivos axénicos de E. invadens y E. histolytica tipo Laredo y Moshkovskii en medio hipotónico según reportaron Richards y col (1966). McConnachie (1970) también investigó el efecto de dilución del medio de cultivo en cultivos axénicos de E. invadens, basados en salina-peptona y extracto de hígado. Encontró enquistamiento del 60-70% cuando cultivos de 1-2 semanas se diluyeron con igual cantidad de agua estéril. Los quistes aparecieron 2-3 días después de la dilución y fueron morfológicamente normales. Thepsuparungsikul y col (1971) pudieron inducir el enquistamiento axénico de la cepa IP-1 de E. invadens, mediante la transferencia de los trofozoítos en crecimiento activo a medio TPS-1 condicionado previamente con el crecimiento de Proteus morganii y filtrado a esterilidad. Obtuvieron 50-80% de enquistamiento en las 48 h siguientes a la transferencia de los trofozoítos. Rengpien y Bailey (1975) sugirieron que el choque osmótico probablemente fue el estímulo que disparó la diferenciación de los trofozoítos. Estos autores midieron la osmolaridad del medio TPS-1 y mostraron que tuvo 400 mOs, la dilución del medio a 70 mOs indujo el enquista-

miento de los trofozoítos. Metabolitos que fueron transportados por acarreadores como aminoácidos, glucosa y cloruro de sodio inhibieron el enquistamiento. Carbohidratos análogos como la fructosa y la galactosa también lo inhibieron. La inhibición inducida por estos agentes que alteraron la osmolaridad del medio de enquistamiento fue revertida cuando los trofozoítos se lavaron y se transfirieron a un medio de enquistamiento normal (Bailey y Rengpien, 1980). Los resultados en opinión de los autores mencionados sugirieron que la tonicidad del medio es una señal requerida para disparar la diferenciación in vitro de E. invadens. Vazquez de Lara y col (1984) descubrieron un método alternativo de inducción del enquistamiento que consistió en la remoción de glucosa del medio de cultivo TYI-S-33 usado para el enquistamiento. Trofozoítos en fase activa de crecimiento transferidos del medio TYI-S-33 al medio TYI-S-33 sin glucosa enquistaron 70-75% en estas condiciones. Los trofozoítos estacionarios no enquistaron en masa y usualmente se lisaron. Se mostró que el enquistamiento dependió de la densidad del inóculo, un cultivo en medio de enquistamiento con  $5 \times 10^4$  células/ml requirió tres días para iniciar el enquistamiento mientras que a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml requirió solo 8 horas. En sus experimentos la osmolaridad del medio no se modificó radicalmente y el enquistamiento se pudo disparar aún sin cambio en ella sugiriendo que no fue el único factor promotor del enquistamiento. Avron y col (1986) hicieron experimentos que complementaron estas observaciones. Propusieron que ambas cosas tanto el descenso de la presión osmótica como el agotamiento de nutrientes fueron los factores esenciales. En contraste con Bailey y Rengpien (1980) encontraron que los trofozoítos se pudieron inducir a enquistar en soluciones de amortiguadores, sales y azúcares a condición de que la

presión osmótica de estas soluciones estuviese entre 60-160mOs/Kg con una óptima inducción a 110mOs/kg. En ensayos encontrados que el suero fue importante pero no esencial ya que el enquistamiento se produjo en su ausencia aunque en baja proporción. Encontraron que soluciones de MgSO<sub>4</sub> 99.5mM, suero bovino 5%(58.8mOs/kg) indujeron un alto porcentaje de enquistamiento a densidades de  $5 \times 10^5$ /ml en 48 h. El enquistamiento en condiciones axénicas de E. histolytica aún no se logra y no se conoce si las cepas aisladas de E. histolytica tengan capacidad de enquistarse. Observaciones de Mata Cardenas y col(1986) indican que probablemente la cepa HMI puede diferenciarse y producir una pared celular típica de quiste en el medio de crecimiento axénico PEHPS. El medio PEHPS es un medio análogo al TPS-1 cuya principal diferencia con respecto a éste es la substitución del PANMEDE por un extracto soluble de hígado y páncreas. En este medio los trofozoítos no se lisaron al llegar a la fase estacionaria como lo hacen en el medio TYI-S-33 y permanecen como células redondeadas. Que en realidad se formó pared celular fue confirmado por la tinción con Calcofluor white M2r colorante que tiñe la quitina de la pared celular. Estos eventos se producen aproximadamente a los 14 días de crecimiento en medio PEHPS. Sin embargo la eficiencia de esta diferenciación no se ha evaluado aún. De confirmarse estas observaciones y si se demuestra un rendimiento elevado se habría llegado a un objetivo largo tiempo perseguido.

#### 10) Variaciones de la densidad

##### celular durante el enquistamiento

Avron y col(1986) descubrieron que la transferencia de los trofozoítos de E. invadens a medio de enquistamiento indujo una variación de la densidad celular. Dentro de los dos minutos siguientes a la transferencia

al medio de enquistamiento la densidad de los trofozoítos varió de 1.061-1.073g/ml a 1.050g/ml incrementándose posteriormente para llegar a una densidad máxima de 1.120g/ml a los 30 minutos y decreciendo posteriormente para quedar en 1.049-1,061 en los quistes maduros. Las razones de estas variaciones de densidad no se comprenden aún pero han sido explotadas para separar poblaciones celulares a partir de cultivos en proceso de enquistamiento (Avron y col, 1983).

#### 11) Factores que afectan el

##### enquistamiento de Entamoeba.

Varios factores han sido señalados como relevantes en el enquistamiento de Entamoeba: El enquistamiento de E. histolytica en medio polixénico solo ocurrió en límites de pH 6.8-7.2 (Chang, 1942), aunque otras observaciones del enquistamiento de E. invadens sugirieron que las variaciones de pH fuera de este rango fueron deletéreas para el crecimiento de los trofozoítos y para el enquistamiento mismo. (Balamuth, 1962). Se ha sugerido que la variación del potencial de oxidorreducción en los cultivos de los trofozoítos creciendo activamente en medio polixénico disparó la diferenciación de E. histolytica (Chang, 1946). El autor mencionado encontró en sus experimentos que los trofozoítos se desarrollaron en un potencial redox de -350, 450mV y una caída súbita de este potencial a niveles positivos indujo enquistamiento masivo de trofozoítos en crecimiento activo en medio polixénico. Balamuth (1962) sin embargo no confirmó estas observaciones. E. invadens crecida monoxénicamente con Clostridium perfringens y sometida a variación del potencial redox no enquistó masivamente y al parecer se afectó negativamente tanto crecimiento como enquistamiento. Es difícil comparar estas observaciones debido a diferencias de medios

de cultivo y especies utilizadas. La temperatura al parecer no fue un factor que afectó el enquistamiento de E. invadens. La incubación por períodos de 6 h a 10°C previa a su transferencia a medio de enquistamiento no modificó el rendimiento de quistes respecto al control (80 vs 82%), aunque incrementó la tasa de crecimiento de los trofozoítos. Un incremento de la viscosidad no afectó las tasas de enquistamiento, pero a niveles de consistencia semisólida 0.3% de agar o sílica gel se incrementó el crecimiento de la población. El hacinamiento se ha señalado como factor que promovió el enquistamiento. Everitt (1950) mostró que la transferencia de un medio libre de almidón polixénico a uno con él, indujo el enquistamiento. En estas condiciones la tasa de enquistamiento de E. histolytica se relacionó con la densidad de los cultivos. Un incremento en el porcentaje de quistes fue proporcional al logaritmo del incremento del tamaño de la población. Balamuth (1962) hizo observaciones similares en E. invadens usando vasos de cultivo con diámetro de fondo determinado a voluntad, la población varió en forma directamente proporcional a la superficie del fondo mientras que el enquistamiento varió de manera inversa a ésta. El autor mencionado sugirió que la iniciación del enquistamiento por hacinamiento se debió a una remoción selectiva del almidón y por tanto atribuible a la depresión de nutrientes en el medio. La acumulación de un submetabolito al parecer no fue importante, en opinión de Myer y Morgan (1971) los factores externos enunciados anteriormente tuvieron poca influencia sobre el enquistamiento de E. invadens y lo consideran como una parte natural de su ciclo de vida y no inducida por factores externos.

## 12) Enquistamiento y virulencia

### en Entamoeba

La relación entre el enquistamiento y la virulencia es un aspecto de la biología de Entamoeba no resuelto pero de gran importancia. Deschiennes (1939) mostró que una cepa de E. histolytica mantenida en medio polixénico sin enquistar decayó en su virulencia en 3 años de 70% a 5% mientras que otra línea mantenida con enquistamiento periódico la preservó. Chang (1945a) encontró que la virulencia de dos cepas de E. histolytica se recuperó a nivel análogo a la del original de su aislamiento mediante inducción del enquistamiento de la cepa in vitro. La cepa C fue infecciosa en pollos por 8 años pero perdió su virulencia en los siguientes 3 años. Su pérdida se correlacionó con la pérdida de la capacidad de enquistarse. La cepa P perdió su virulencia en 2.5 años de cultivo y coincidió con la pérdida de la capacidad de enquistamiento en cultivo. Neal (1965) por otra parte no pudo inducir incremento en la virulencia de 3 cepas de E. histolytica y se sugirió que no hubo una relación directa entre la capacidad de enquistarse y la virulencia de las cepas mantenidas en medio de Dobell. Neal (1965, 1966), realizó experimentos con las cepas aisladas de portadores asintomáticos y sintomáticos e indujo su enquistamiento in vitro y probó la invasividad en animales experimentales. Encontró que las cepas no invasivas enquistaron normalmente en el medio de cultivo pero su virulencia medida como invasividad cecal no se incrementó. La cepa RD cuya virulencia decayó después de varios ciclos de enquistamiento al nivel de una cepa no invasiva arguyó contra una relación directa de enquistamiento y virulencia. Phillips y Bartgis (1954) observaron que E. histolytica crecida con Tripanosoma cruzii perdió su capacidad de enquis-

tamiento y virulencia cuando fue inoculada intracecalmente en cobayos, pero se pudo restaurar la virulencia de la cepa retornando las amibas a medio polixénico y reiniciando los cultivos a partir de quistes. Aunque el restablecimiento de la virulencia fue temporal y duró 3-8 semanas cuando la cepa se cultivó en presencia de T. cruzii. Estudios de Phillips (1973) en la cepa NIH200 de E. histolytica mostraron que perdió su virulencia por mantenimiento prolongado en medio de cultivo axénico. Se trató de restaurar su virulencia transfiriéndola a medio polixénico de Locke-huevo-harina de arroz y con combinaciones de Bacteroides sp., C. perfringens, Streptococcus faecalis, Escherichia coli y con flora bacteriana desconocida con objeto de inducir el enquistamiento. La cepa NIH200 fue incapaz de enquistar nuevamente y al probar su virulencia mediante inyección intracecal en cobayos libres de gérmenes y normales también fue incapaz de producir lesiones. En su opinión la cepa perdió su potencial de enquistamiento irreversiblemente y esto se relacionó íntimamente con la pérdida irreversible de la virulencia que se observó. En E. invadens no se han hecho observaciones con respecto a la relación de la capacidad de enquistarse y su virulencia.

### 13) Relación de las bacterias

y el enquistamiento en Entamoeba.

Las bacterias ejercen un profundo efecto sobre el ciclo de vida de las amibas del género Entamoeba como fue demostrado por Dobell en sus trabajos (Dobell, 1928, 1951). En un medio con las bacterias intestinales nativas fue posible reproducir todas las fases del ciclo de vida del parásito. En experimentos iniciales Dobell descubrió que las cepas de E. histolytica que aislo y que no eran enquistantes : pudieron inducirse a enquistar

cuando la flora bacteriana en que crecieron fue substituida por la flora de la cepa K28c cuya composición bacteriana fue tal que pudo soportar tanto el crecimiento como el enquistamiento de K28c. Un análisis de la composición de las especies del cultivo fue un problema complejo pero utilizando acriflavina para eliminar selectivamente los aeróbios y violeta de genciana para eliminar selectivamente los anaeróbios encontró que un anaeróbio, N5, fue esencial para el enquistamiento de E. histolytica en cultivo polixénico en tanto que las bacterias aeróbias al consumir el oxígeno disponible dentro del tubo de medio de cultivo solo proporcionaron el ambiente anaeróbio apropiado para el crecimiento de las amibas y del anaeróbio N5. Lamy y col (1958, 1963). Estudió el efecto de la remoción selectiva de bacterias sobre el enquistamiento de E. histolytica. La adición de penicilina al medio polixénico eliminó los anaerobios pero no los aeróbios permitiendo la multiplicación de los trofozoítos de la cepa LX pero no la formación de quistes. La adición de aureomicina que eliminó S. faecalis pero no E. coli. y anaeróbios en el medio de cultivo provocó crecimiento subnormal y aparición de quistes mientras que la adición de kanamicina que eliminó E. coli pero no S. faecalis y anaerobios dio lugar a cultivos pobres casi sin quistes. En opinión del autor anterior los resultados sugirieron que los anaerobios constituyeron los inductores del enquistamiento pero su actividad no fue suficiente ya que la multiplicación soportada por E. coli y S. faecalis fue prerequisite para el enquistamiento. Otros estudios señalan el papel de los anaerobios en el enquistamiento. En medios polixénicos Svensson y col (1971), reportaron que E. histolytica crecida en medio de extractos de colon y almidón completó su ciclo de vida incluyendo el enquistamiento. Las cepas aisladas con bacterias de las regiones distales del colon enquistaron espontánea-

mente, mientras que las cepas aisladas con bacterias de las regiones proximales no lo hicieron. Los resultados de estos experimentos son difíciles de evaluar debido a la complejidad de la comunidad bacteriana y su conocimiento solo parcial. Un estudio de la influencia de las bacterias con conocimiento exacto de las especies involucradas fue efectuado por Chinn y col (1942). De 14 especies de bacterias que soportaron el crecimiento de E. histolytica individualmente ninguna fue capaz de inducir el enquistamiento en medio monoxénico. En mezclas de dos componentes bacterianos se mejoró el crecimiento pero solo las combinaciones con C. perfringens estimularon la formación de quistes apreciablemente. Streptococcus hemolyticus - C. perfringens y Leptotrichia bucalis - C. perfringens indujeron la formación de 40% de quistes en 48-72 h. Combinaciones de 3 especies produjeron resultados variables. S. hemolyticus - B. subtilis - C. perfringens 25%, S. hemolyticus - Alcaligenes faecalis - C. perfringens, 12%, S. hemolyticus - E. coli - C. perfringens 2%, S. hemolyticus - S. faecalis - C. perfringens 15%, indicando que C. perfringens fue esencial. Al parecer otras bacterias indujeron el enquistamiento ya que cultivos sin C. perfringens también enquistaron (Chinn y col, 1942). En resumen al parecer E. histolytica y otras Entamoebas interaccionan en su hábitat natural con una comunidad bacteriana compleja que influye sobre su ciclo de vida. Cuando en el medio de cultivo sea posible obtener definitivamente las condiciones prevalecientes en dicho ambiente podremos inducir a voluntad el enquistamiento. Según Lamy (1957, 1958). la observación de enquistamiento espontáneo en cultivos bacterianos refleja las condiciones del intestino. En un equilibrio adecuado de las bacteria en competición, el ciclo de vida completo podría obtenerse.

#### 14) Supervivencia de los

quistes de Entamoeba.

Sobre todo desde el punto de vista epidemiológico es importante conocer las condiciones en las que los quistes pueden mantener su viabilidad. (Offutt y col, 1955). Varios autores han ideado métodos de evaluar la viabilidad de los quistes procedentes de cultivo o aislados de las heces. La tinción con eosina diluida, eosina-yodo, ortotoluidina, la forma del núcleo la tinción con Hematoxilina, la plasmólisis han sido evaluados para medir la viabilidad de los quistes aunque ninguno de ellos se encontró satisfactorio (Cheng, 1973, Kudo, 1960). La evaluación de la viabilidad de los quistes por subcultivo es un método más eficiente y en la actualidad el más empleado. Chang y Fair (1941) demostraron que tan solo 5 quistes viables pudieron dar un cultivo positivo de E. histolytica. Beaver y Deschamps (1949) observaron un número de 15 como mínimo. Stringer (1972) propuso un bioensayo de viabilidad basado en la suposición de que en un subcultivo un quiste vacío representaba una amiba exquistada. El número de quistes vacíos respecto a los no eclosionados fue una medida del porcentaje de viabilidad.

#### 15) Efectos de la temperatura

sobre la viabilidad de los

quistes de Entamoeba.

La temperatura tiene un efecto notable sobre la supervivencia, maduración y viabilidad de los quistes de Entamoeba. La maduración de los quistes de E. histolytica se detuvo cuando se disminuyó la temperatura del medio de cultivo (37°C) a una temperatura inferior (4-23°C). Esta maduración no se reanuda nuevamente por elevación de la temperatura a 37°C. (Chang, 1943).

En los quistes maduros la desecación fue letal (Reardon y col, 1952) por lo que el efecto de la temperatura sobre los quistes se ha experimentado en quistes en suspensión o en asociación con medios orgánicos tales como heces o vegetales que los mantienen húmedos. En los quistes maduros se tiene la creencia que la tasa de supervivencia depende de la tasa metabólica del quiste. McConnachie ha señalado que la longitud de tiempo que los quistes sobreviven en relación con la temperatura dependió de la tasa de desaparición de glucógeno y de los cuerpos cromatoides indicando una influencia de la temperatura sobre el metabolismo de los quistes así como sobre su tiempo de viabilidad. El medio de suspensión de los quistes al parecer no tuvo efecto sobre la viabilidad temporal de los quistes en relación a la temperatura (Chang, 1950). Los quistes de Entamoeba fueron menos resistentes al frío y al calor que lo que son las esporas de bacterias y hongos comparativamente. Las bajas temperaturas tuvieron efectos deletéreos pero la tasa de supervivencia fue mayor que en altas temperaturas (Chang, 1945, 1950, Harper & Dolkhart, 1954, Jones & Newton, 1950, Simitch y col 1954, Neal, 1974).

16). Efectos de las sustancias  
químicas sobre la viabilidad de  
los quistes de Entamoeba.

El estudio del efecto cisticida de los compuestos químicos es de la mayor importancia para promover métodos de potabilización del agua ya que los quistes son epidemiológicamente los factores responsables de la transmisión de la amibiasis. Una delimitación precisa de las concentraciones letales para el parásito ha permitido erradicar en algunos países las epidemias causadas por E. histolytica. Como en el caso de la temperatu-

ra los trofozoítos fueron de manera general más sensibles al efecto de los compuestos químicos que los quistes en las mismas condiciones. Los agentes desnaturalizantes, generadores de radicales libres, el íon cloro, yodo, los agentes oxidantes, los detergentes y los metales pesados fueron los más activos (Kudo, 1960, Cheng, 1973, Fair y col, 1954, Jones, 1952, Kessel y Moore, 1946).

17) Desenquistamiento y factores  
asociados en Entamoeba.

En el huésped los quistes completan su desarrollo, desenquistando en el intestino delgado. El desenquistamiento como ocurre en el huésped ha sido estudiado examinando los contenidos intestinales a diferentes intervalos de tiempo después de alimentar con quistes a huéspedes apropiados. De esta manera los estadios de desenquistamiento de E. histolytica han sido observados en monos ratas y perros (Snyder y Meleney, 1954, Neal, 1966). Mientras en las serpientes se han observado los estadios de desenquistamiento de E. invadens (Geiman y Rattcliffe, 1936). En cultivo in vitro E. histolytica y E. invadens desenquistan y sus estadios de desenquistamiento han sido observados (Dobell, 1928, Geiman y Rattcliffe, 1936). Durante el desenquistamiento el citoplasma se retrae de la pared y la amiba enquistada se mueve activamente dentro de la pared del quiste. El movimiento de los pseudópodos se concentra en un área de la pared y la amiba emerge a través de una apertura de ésta, escapando a través de un pequeño poro. Inicialmente una pequeña cantidad del citoplasma protuye pero más tarde se retrae. Solo después de movimientos repetidos hacia atrás y adelante la amiba puede liberarse. En E. invadens la pared del quiste desenquistante se observó desaparecer. Barker y Svila (1964) observaron modificaciones

del material de la pared del quiste que absorbió luz UV durante el desenquistamiento. La forma en que la amiba penetra la pared del quiste no es conocida, enzimas conectadas con la membrana de la amiba enquistada pueden afectar la apertura y los ribosomas que se dispersan de los cuerpos cromatoides durante el desenquistamiento pueden promover la síntesis de tales enzimas. Los quistes desenquistaron en medio que soportó el crecimiento de los trofozoítos indicando que no se tienen requerimientos especiales (Chang, 1943, Snyder y Meleney, 1941). La anaerobiosis es requerida pero quistes de E. histolytica desenquistaron bajo potenciales redox mayores que los necesarios para el crecimiento de los trofozoítos (Chang, 1946). Se pensó originalmente que un quiste estaba listo para eclosionar cuando ya exhibía 4 núcleos pero carecía de glucógeno y cuerpos cromatoides. Algunos investigadores sugirieron que cuando estas inclusiones estaban presentes en los quistes eran capaces de eclosionar (Dobell, 1928), Pero algunos quistes desenquistante uni y bi- y tetranucleados con la presencia de cuerpos cromatoides se ha observado (Everitt, 1950, Snyder y Meleney, 1941). Los quistes uninucleados de una cepa de E. histolytica se han observado desenquistar. Chang (1943) sin embargo observó que los quistes inmaduros no eclosionaron. Los quistes de E. invadens y E. histolytica difirieron en su capacidad de eclosionar in vitro. E. histolytica eclosionó más fácilmente que E. invadens (Geiman & Rattcliffe, 1936, McConnachie, 1955). Los quistes de E. histolytica eclosionaron pocos minutos después de su transferencia a medio de crecimiento a temperatura óptima de crecimiento. En estas condiciones muy pocos quistes de E. invadens desenquistaron aun en horas (McConnachie, 1955). Dobell notó que los quistes formados en cultivos tempranos de E. histolytica desenquistaron en el mismo tubo de cul-

tivo pero los formados en cultivos viejos murieron al menos que se transfirieran a medio fresco cuando que hay factores del medio que afectan el desenquistamiento(Dobell,1928).

18)Estructura antigénica de los  
quistes de E. invadens.

Los quistes de E.invadens comparten antígenos con los trofozoítos de la misma especie(Zaman y col,1967).e inclusive con los trofozoítos de E. histolytica,razón por la cual han sido utilizados como substitutos en las pruebas de detección de amibiasis humana.Los homogenizados de quistes de E.invadens reaccionaron con sueros de pacientes con amibiasis en la prueba de inmunohemaglutinación y substituyeron al antígeno de E.histolytica con resultados similares(Zaman y col,1967).Los antígenos que presentaron los quistes no fueron idénticos a los de los trofozoítos.Existieron diferencias estadio específicas,es decir antígenos exclusivos del quiste Avron y col,1986).Las similitudes y diferencias antigénicas de trofozoítos y quistes de E.invadens no se han identificado sistemáticamente aún. Los quistes de E.histolytica se aglutinaron por suero de humano normal y de individuos con amibiasis carentes de complemento.La naturaleza de las aglutininas no se estableció pero pudieron ser anticuerpos(Greiff,1947). La pared de los quistes fue antigénica e indujo la aparición de anticuerpos específicos.Mediante la técnica de inmunofluorescencia se logró teñir los quistes fluorescentemente en su zona periférica.(Zaman y col, 1966).

## II. OBJETIVOS.

La revisión que se realiza de la literatura indica que se sabe poco en relación a las modificaciones fisiológicas que se dan en la célula trofozoíto durante el proceso de diferenciación de ésta a quiste. Respecto a los cambios bioquímicos que se han observado durante la diferenciación de la amiba se considera que las enzimas son muy importantes en el metabolismo de los trofozoítos y que el muestreo de su actividad puede revelar valiosa información para comprender lo que sucede durante el enquistamiento de este parásito y así introducir un nuevo enfoque en el estudio del enquistamiento ya que en la revisión de la literatura no se encontraron referencias respecto a estudios comparativos de isoenzimas en diferentes estadios del ciclo de vida de los parásitos del género Entamoeba. Es por esto que se decidió estudiar las isoenzimas de varias enzimas de diversas áreas del metabolismo del parásito con el siguiente objetivo general:

Identificar enzimas que puedan ser marcadores bioquímicos adecuados del enquistamiento de los trofozoítos de E. invadens.

En particular, orientar el estudio a los siguientes puntos:

a) Identificar marcadores bioquímicos dentro del metabolismo de los carbohidratos, monitoreando la aparición o desaparición de isoenzimas en la vía de la degradación de la glucosa. Entre estas enzimas se seleccionaron 6 enzimas que son de primera importancia para la supervivencia del trofozoíto como son: hexokinasa, glucosafosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, malato deshidrogenasa descarboxilante, alcohol deshidrogenasa NAD y NADP dependientes, amilasa y quitinasa. Estas últimas enzimas que también están asociadas con el metabolismo de los polisacáridos son muy importantes para la supervivencia y el enquistamiento del parásito.

b). Identificar marcadores bioquímicos del enquistamiento entre las enzimas hidrolíticas inespecíficas como las esterases y proteinasas, analizando la aparición o desaparición de isoenzimas de estas enzimas durante el enquistamiento.

c). En vista que las Fe-proteínas aún no siendo enzimas son centrales en el metabolismo de los trofozoítos se seleccionó también a estas proteínas para estudiar su patrón de variación durante la diferenciación.

### III.MATERIAL Y METODOS.

#### 1)Cepa empleada.

En los experimentos que se reportan en este trabajo se empleó la cepa de E. invadens IP-1 aislada en el año de 1952 de la serpiente Natrix cyclopion.Esta cepa se obtuvo del doctor L.S.Diamond y se ha cultivado por más de 10 años en nuestro laboratorio.

#### 2)Medio de cultivo.

El cultivo vegetativo de la amiba se llevó a cabo empleando el medio TYI-S-33(Diamond y col,1978).Los componentes de este medio se enlistan en la tabla I .Para la preparación del medio los componentes se disolvieron en agua bidestilada en el orden indicado,el pH se ajustó a 6.8 con NaOH 0.1N y se aforó a 87 ml con agua bidestilada,este medio se esterilizó a 121°C por 20 minutos a 20 libras de presión en autoclave.Antes de usarse se adicionó de 3 ml de la mezcla vitamínica de Diamond (Diamond y col,1968) y de 10 ml de suero bovino para completar un volumen final de 100 ml.

#### 3)Medio de enquistamiento.

El enquistamiento de los trofozoítos se llevó a cabo empleando el medio TYI-S-33-(LGM) descrito por Vázquez de Lara y col.(1984).Este medio se preparó de manera similar al medio TYI-S-33 excepto que se omitió en su composición la glucosa.El medio se esterilizó a 121°C a 20 libras de presión por 20 minutos y se suplementó con la mezcla de vitaminas de Diamond y suero bovino de manera análoga al medio TYI-S-33.

#### 4)Mantenimiento de los cultivos.

Se emplearon tubos de tapón rosca de 15 ml de capacidad conteniendo 13 ml de medio de crecimiento.El inóculo se preparó a partir de un cultivo

TABLA I.

Composición del medio cultivo TYI-S-33(Diamond,1978).

COMPONENTE	CANTIDAD(g).
Trypticasa	3
Glucosa	1
Cloruro de sodio	0.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .	0.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .	0.06
L-cisteína	0.1
Acido L-ascórbico.	0.02
Citrato-férrico-amónico.	0.00228.
Agua bidestilada.	cbp 87 ml
Mezcla de vitaminas de Diamond	3 ml
Suero bovino	10 ml
Volumen total	100 ml.

de una semana, el tubo conteniendo este cultivo se enfrió durante 10 minutos en agua con hielo para desprender las amibas adheridas a las paredes del tubo. Las amibas se colectaron por centrifugación a 300xg durante 5 minutos. Se inocularon suficientes amibas para obtener una densidad de  $1 \times 10^4$ /ml. Los tubos así inoculados se incubaron a 26°C durante 7 días.

#### 5) Conteo de las células.

Para estimar el número de células en un cultivo se tomaron muestras de 0.5 ml. Las células de las muestras se diluyeron 10 veces en solución de fijación de amibas (Amortiguador de fosfatos 15 mM, formaldehído 2.7% (v/v) y se contaron en un hemocitómetro Neubauer mejorado. Una gota de la solución con las células previamente diluida se depositó en las dos cámaras del contador de células. Las células se contaron en los 4 cuadrados principales y el cuadrado central bajo el microscopio de contraste de fases usando el objetivo de 40x. El número promedio de trofozoítos contados se multiplicó por  $10^5$  que fue el factor de dilución empleado. Este procedimiento proporcionó la información del número de amibas por mililitro en los cultivos empleados.

#### 6) Cultivo y cosecha de los trofozoítos.

Se emplearon matraces Erlenmeyer de un litro con tapón rosca conteniendo 500 ml de medio TYI-S-33 estéril. Los matraces se inocularon con trofozoítos de E. invadens IP-1 en crecimiento activo a una densidad de  $5 \times 10^4$  amibas/ml y se incubaron durante una semana a 26°C. Para cosechar los trofozoítos los cultivos se enfriaron durante 10 minutos en un baño de agua con hielo, a continuación los cultivos se transfirieron a tubos de centrifuga de fondo cónico de 50 ml y se centrifugaron a 500xg en una

centrífuga IEC-CRU 5000 durante 10 minutos a 0°C. El medio de cultivo sobrenadante se extrajo por aspiración con pipeta Pasteur. Los trofozoítos se resuspendieron con solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, NaCl 0.9%(p/v) (PBS) y se centrifugaron como se describió anteriormente. La solución de PBS sobrenadante se eliminó de nuevo por aspiración con pipeta Pasteur y los trofozoítos se resuspendieron en solución de lisis (Ac. maléico 1mM, ditiotreitól 1mM, EDTA 1mM, ácido e-aminocaproico 1mM). El volumen usado fue aproximadamente el doble del paquete celular.

#### 7) Enquistamiento de los trofozoítos

su cosecha y purificación.

La inducción del enquistamiento de los trofozoítos se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Vázquez de Lara y col (1984). Los trofozoítos de E. invadens se crecieron masivamente en matraces Fernbach de 2800 ml conteniendo 1500 ml de medio TYI-S-33 estéril. El inóculo se ajustó para lograr una densidad de  $5 \times 10^4$  amibas/ml. Cuando la capa de amibas en el fondo del matraz alcanzó confluencia aproximadamente en 7 días de incubación a 26°C, los trofozoítos se cosecharon previa incubación en el hielo durante 5 minutos. Las amibas se transfirieron en condiciones asépticas a tubos de centrífuga de fondo cónico estériles de 50 ml con tapón rosca y se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos. El sobrenadante del medio se eliminó por aspiración con pipeta Pasteur estéril, las amibas se lavaron mediante resuspensión en medio de enquistamiento LGM estéril y se centrifugaron de nuevo por 5 minutos a 300xg. Las células se resuspendieron de nuevo en medio LGM. Se determinó el número de amibas y se ajustó a  $5-6 \times 10^5$  amibas/ml. El medio de enquistamiento inoculado de esta forma se distribuyó en tubos estériles de tapón rosca (13ml/tubo). Las células se incubaron durante 96 h a 26°C en una estufa de cultivo de temperatura

controlada. Los cultivos enquistantes se muestrearon a las 96 h con objeto de confirmar el progreso del enquistamiento. La determinación del número de quistes se llevó a cabo de la siguiente forma: Se resuspendieron las amibas presentes en un tubo de cultivo mediante inversión repetida de éste sin haberlo enfriado en hielo. Bajo condiciones asépticas se tomó una muestra del cultivo, este se tiñó adicionalmente con una gota de Calcofluor White M2r al 0.1%(p/v) en Tris-HCl 0.4M pH 7.0. Una gota del cultivo teñido se colocó entre porta y cubreobjetos y se examinó mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon empleando la combinación de filtros V-2A (Excitación 380-425nm y barrera 450 nm). En estas condiciones la presencia de pared en las células da lugar a fluorescencia intensa de tono azul mientras que los trofozoítos que no han empezado a formar pared no emiten fluorescencia. Mediante este método se evaluó el porcentaje de quistes presentes en el cultivo. En general se contaron 100 células en cada determinación. Cuando el porcentaje de quistes alcanzó 70-80% (aproximadamente en 96 h), los quistes se colectaron mediante centrifugación a 300xg durante 5 minutos.

#### 8) Método de purificación de los quistes de E. invadens.

Los quistes se separaron de los trofozoítos mediante centrifugación en un gradiente de Percoll siguiendo el procedimiento descrito por Avron y col(1983): Los cultivos obtenidos en medio de enquistamiento se incubaron en hielo por 10 minutos. Los cultivos provenientes de 4-5 tubos se vaciaron en un tubo de centrifuga de 50 ml con tapón rosca y se centrifugaron a 300xg por 5 minutos. El sobrenadante se desechó y la pastilla conteniendo los quistes se resuspendió en una solución de Percoll al 100%

(Percoll[Pharmacia] en amortiguador de fosfatos 0.1M, NaCl 0.9%(p/v)). Encima de esta suspensión se puso un disco de polietileno poroso para evitar la mezcla de las capas de Percoll al superponerlas. Se superpuso primero 1 ml de solución de Percoll al 70% seguida de 1 ml de Percoll al 60% y así sucesivamente de cada una de las siguientes concentraciones: 50%, 40%, 30%, 20%, 10%. Las diluciones del Percoll al 100% se efectuaron con amortiguador de fosfatos 0.1M, NaCl 0.9%(p/v). El gradiente se construyó del fondo a la superficie en un tubo de 12.5x1.5cm diámetro. Los tubos con el gradiente construido de esta manera se centrifugaron a 300xg durante 30 minutos. Los quistes se localizaron como una banda entre el 30-50% de Percoll mientras que los trofozoítos migraron al fondo. La banda con los quistes se aspiró con una pipeta Pasteur con bulbo de goma cuidando de no mezclar las capas del gradiente. Los quistes se lavaron de los residuos de Percoll mediante centrifugación en PBS a 300xg por 10 minutos. La solución sobrenadante se eliminó. Los quistes se resuspendieron en solución de lisis. La cantidad de solución de lisis empleada fue aproximadamente el doble del volumen del paquete de quistes.

9) Preparación de extractos libres de células de trofozoítos y quistes.

Las células (trofozoítos o quistes purificados) se resuspendieron y se transfirieron a un homogenizador de vidrio con émbolo de Teflón y se homogenizaron con 50-70 golpes del émbolo. Los homogenizados de las células se guardaron en recipientes de plástico bajo nitrógeno líquido hasta su centrifugación. Para centrifugarse los homogenizados de los trofozoítos o quistes se descongelaron a temperatura ambiente y se transfirieron a un tubo de centrífuga. Se centrifugaron a 30,000xg en una centrífuga Ser-

vall con rotor SS-34 a 4°C durante 16 minutos. Los sobrenadantes de los extractos se separaron cuidadosamente y se distribuyeron en muestras alícuotas de 300  $\mu$ l aproximadamente en tubos de plástico. Los tubos conteniendo los extractos se almacenaron bajo nitrógeno líquido hasta su estudio posterior.

10) Determinación del contenido de proteínas de los extractos de trofozoítos y quistes de E. invadens IP-1.

Se determinó el contenido de proteína por mililitro tanto de los extractos de trofozoítos como de quistes por el método de Lowry y col (1952). Como estándar se empleó albúmina de suero bovino.

11) Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Las enzimas presentes en los extractos celulares se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando el sistema de electroforesis discontinua en condiciones no desnaturizantes descrito por Davis (1964). Se empleó un aparato de electroforesis Hoeffer 600 (Hoeffer Sci. Sn Francisco). Se construyeron geles de poliacrilamida en placa de 16x14x0.1cm. La matriz de poliacrilamida correspondiente al gel separador (tamiz de separación de las macromoléculas) se preparó con una concentración final de acrilamida-bisacrilamida de 7.5% C, 5% C, en amortiguador Tris 0.237M, HCL 0.072N, pH 8.48, persulfato de amonio 0.07% (p/v), TEMED 0.07% (v/v). Se usaron aproximadamente 30 ml de solución para construir un gel separador con dimensiones de 10.5x14x0.1cm. La solución se dejó polimerizar 30 minutos aproximadamente. Con objeto de que la polimerización fuera homogénea se depositó una capa de agua bidestilada en la superficie superior

del gel en proceso de polimerización. La superficie del gel polimerizado se enjuagó con agua bidestilada para eliminar los restos de acrilamida no polimerizada y sobre éste se construyó el gel concentrador con dimensiones de 3x14x0.1cm. La solución del gel concentrador se compuso de acrilamida-biscacrilamida 3.125%T, 20%C en amortiguador de composición Tris 39mM, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.072N, pH 6.9, persulfato de amonio 0.1%(p/v), TEMED 0.1%(v/v). Encima de la solución del gel concentrador se procedió a colocar un peine de separación con capacidad para formar 10 pozos evitando atrapar burbujas. La solución se dejó polimerizar durante 10 minutos y el peine se retiró cuidadosamente. Los restos de acrilamida no polimerizados se retiraron enjuagando la superficie con agua. En nuestros experimentos usualmente usamos dos placas por corrida electroforética. Las placas con los geles de poli-acrilamida polimerizados se colocaron en la cámara de reservorio del aparato de electroforesis y éste se llenó con las soluciones del electrodo superior Tris 37.6mM, glicina 40 mM, pH 8.89 con un volumen de 1000 ml y la solución del electrodo inferior Tris 63mM, HCl 50 mM, pH 7.47, con un volumen de 4000 ml. Los extractos de trofozoítos y quistes se descongelaron a temperatura ambiente. Se les adicionó a cada extracto cantidades iguales de solución de glicerol 20%(v/v) conteniendo azul de bromofenol al 0.1%(p/v). En cada carril se depositó la cantidad del extracto necesaria para acumular 50 µg por carril. Se tuvo cuidado de depositar concentraciones iguales de proteína en los carriles de quistes y trofozoítos. Para distinguir los carriles donde corrieron los extractos de trofozoítos de los carriles donde corrieron los extractos de quistes numeramos los carriles de izquierda a derecha del 1-10. Los carriles no-nes se llenaron con extracto de trofozoítos y los carriles pares se lle-

naron con extracto de quistes. En ocasiones cuando la actividad fue baja la concentración de proteína se incrementó proporcionalmente en ambos carriles donde corrieron quistes y trofozoítos. La electroforesis se efectuó a temperatura constante de 4°C mantenida por un sistema de recirculación de agua acoplado a una unidad de refrigeración MGW Lauda RGC, Brinkman Instruments. La electroforesis se efectuó a corriente constante de 30 mA por placa suministrada por una fuente de poder PS500X (Hoeffer Sci. Sn, Fco). hasta que el colorante azul de bromofenol usado como marcador de la electroforesis migró al final del gel usualmente en 2.5-3 horas. Una vez concluida la electroforesis los geles se sacaron y se manipularon de acuerdo al tipo de actividad enzimática por ensayar.

12) Detección de las bandas con actividad enzimática en los geles de poliacrilamida.

Los geles con las proteínas separadas electroforéticamente se sacaron de las placas de cristal, se eliminó el gel concentrador y se cortaron a la mitad en forma vertical de tal manera que se dejaron 5 carriles de cada lado de la región de corte. Los geles cortados se marcaron apropiadamente para asegurar sin ambigüedad las zonas de inicio y finalización de la corrida electroforética así como los carriles correspondientes a los extractos de quistes o de trofozoítos. En todos los casos a menos que se indique lo contrario, los geles se depositaron en cajas de cristal construidas especialmente para contener pequeños volúmenes y se bañaron con la solución reveladora de la actividad enzimática correspondiente. Las actividades de hexokinasa, glucosa fosfato isomerasa, malato deshidrogenasa descarboxilante y fosfoglucomutasa se detectaron de acuerdo al método descrito por Mathews y col (1982) y Meráz Ríos y col (1984). La ac-

tividad de alcohol deshidrogenasa NAD dependiente y de alcohol deshidrogenasa NADP dependiente se detectaron de acuerdo al sistema descrito por Thorig y col(1975).La actividad de amilasa en los geles se detectó de acuerdo al método de Ward y col(1974).La actividad de quitinasa en geles se detectó de acuerdo al método de Trudell y Asellín(1989).La actividad de proteinasa se detectó de acuerdo al método de Ostoa-Saloma y col(1985),empleando caseína como substrato.La actividad de esterasa se detectó de manera similar al método descrito por Market y Hunter(1957), empleando a-naftil-acetato como substrato y Fast Red ITR como agente acoplante.Aunque no son actividades enzimáticas se comparó el patrón de ferroproteínas (Fe-proteínas),proteínas que contienen Fe como componente estructural y/o funcional de trofozoítos y quistes.Para este propósito se empleó el método descrito por Kuo y Fridovich(1986).En general en algunos casos se hicieron ligeras modificaciones a los métodos descritos con objeto de adecuarlos a las condiciones de nuestros experimentos.A continuación se describen brevemente los métodos de detección empleados. Para detectar la actividad de hexokinasa,el gel se sumergió en 30 ml de una solución compuesta por Tris-HCL,0.2M pH 7.4,NADP  $3 \times 10^{-4}M$ ,glucosa  $1.1 \times 10^{-1}M$ ,1 U/ml de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de levadura,MgCl<sub>2</sub> 0.01 M,MTT  $5 \times 10^{-4}M$ ,PMS  $1 \times 10^{-4}M$ ,ATP  $1 \times 10^{-3}M$ .El gel se incubó a 37°C o temperatura ambiente en baño María en la obscuridad el tiempo necesario para que las bandas de actividad fueran claramente visibles.

Para detectar la actividad de malato deshidrogenasa descarboxilante,el gel se sumergió en 30 ml de una solución de la composición siguiente: Tris-HCl 0.2M pH 7.4,NADP  $3 \times 10^{-4}M$ ,ácido maleico 0.03M ajustado previamente a pH 7.0 con NaOH 0.1N,MgCl<sub>2</sub>0.01M,MTT  $5 \times 10^{-4}M$ ,PMS  $1 \times 10^{-4}M$ .El gel

se incubó a 37°C en la oscuridad en baño María el tiempo necesario para la aparición de las bandas.

Para detectar la actividad de fosfoglucomutasa el gel se sumergió en 30 ml de solución de la composición siguiente: Tris-HCl 0.2M, pH 7.4, NADP  $3 \times 10^{-4}$ M, glucosa 1-Fosfato  $6.6 \times 10^{-3}$ M, 0.4 U/ml de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de levadura, MgCl<sub>2</sub> 0.01M, MTT  $5 \times 10^{-4}$ M, PMS  $1 \times 10^{-4}$ M, el gel se incubó a 37°C en la oscuridad en baño María el tiempo necesario para que las bandas de actividad fueran visibles.

Para detectar la actividad de glucosa fosfato isomerasa el gel se sumergió en 30 ml de una solución de la siguiente composición: Tris-HCl 0.2M pH 8.0, NADP  $3 \times 10^{-4}$ M, fructosa 6-fosfato  $1 \times 10^{-3}$ M, 2 U/ml de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de levadura., MgCl<sub>2</sub> 0.01M, MTT  $5 \times 10^{-4}$ M, PMS  $1 \times 10^{-4}$ M.

El gel se incubó en el contenedor de cristal en baño María a 37°C en la oscuridad el tiempo necesario para que las bandas fueran visibles.

Para detectar la actividad de alcohol deshidrogenasa NADP dependiente el gel se sumergió en 30 ml de solución de la composición siguiente: amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 0.01M, MTT  $6 \times 10^{-4}$ M, PMS  $3 \times 10^{-4}$ M, isopropanol 10%(v/v), NADP  $7 \times 10^{-4}$ M, el gel se incubó en la oscuridad a 37°C en baño María o temperatura ambiente el tiempo necesario para que las bandas de actividad fueran claramente visibles.

Para detectar la actividad de alcohol deshidrogenasa NAD dependiente se empleó la misma mezcla de reacción anterior excepto que el NADP se substituyó por NAD a la misma concentración. El gel se incubó en la oscuridad en baño María a 37°C el tiempo suficiente para que las bandas fueran claramente visibles.

Para detectar la actividad de amilasa el gel se sumergió en 100 ml de una solución de almidón soluble al 0.1%(p/v) en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 6.4, NaCl 0.015 M, azida de sodio 0.001M a temperatura de 37°C y se incubó durante 1-2 horas. Después de la incubación el gel se enjuagó y se sumergió en una solución de yodo 1%(p/v), yoduro de potasio 3%(p/v) durante el tiempo suficiente para que el almidón no degradado se tiñera uniformemente. El exceso de solución de tinción se removió por lavado del gel en agua destilada.

Para detectar la actividad de quitinasa se preparó glicol-quitina de acuerdo al método descrito por Trudell y Asellin(1989), a partir de anhídrido acético y glicol-quitosana. La glicol-quitina preparada de este modo se incorporó en un gel de detección de 14x16x0.075cm, con una concentración de acrilamida de 7.5%, bisacrilamida 5%, conteniendo glicol quitina 0.02%(v/v) en Tris-HCl 0.1M, pH 7.4. Este gel de detección se puso en contacto directo con el gel de poli(acrilamida) en el que las proteínas de los extractos de quistes y trofozoítos habían sido separadas electroforéticamente. Se eliminaron las burbujas de aire atrapadas entre ambos geles y se presionaron el uno contra el otro de manera que se asegurara un contacto íntimo entre ellos. Para mantener la presión entre ellos, el sandwich formado se metió en una bolsa de polietileno que contenía una toalla húmeda. Se incubó durante 18 horas en una estufa a 37°C. Una vez concluida la incubación el gel de detección se sumergió en una solución de Calcofluor white M2r 0.01%(p/v) en tris-HCl 0.5M pH 8.9 por 6 minutos. El gel de detección se sacó de la solución y se lavó por incubación en agua destilada durante una hora. Las zonas donde hubo destrucción de la glicol quitina se mostraron por zonas carentes de fluorescencia en el gel de detección.

Para detectar la actividad de esterasa el gel se incubó en una solución de la composición siguiente: a-naft cetato  $2 \times 10^{-3} M$ , acetona 2% (v/v) en amortiguador de fosfato 0.1M pH 7.5, Esta solución se preparó fresca cada vez que se requirió. El volumen usado fue de 50 ml. El gel se incubó a  $37^{\circ}C$  en baño María durante 1-1.5 horas. Después de la incubación el gel se enjuagó con agua destilada y la actividad de esterasa se reveló por inmersión en una solución de la composición siguiente: Fast Red ITR sal (diazotato-N-N'-diethyl-4-metoxianilina)  $8 \times 10^{-3} M$ , como agente acoplante en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.3. La solución de Fast Red ITR se preparó fresca en cada ocasión y siempre se filtró a través de papel Whatmann no.1 antes de usarse. La reacción de acoplamiento se efectuó a temperatura ambiente. Las bandas de actividad enzimática se tiñeron de color rojo casi inmediatamente después de difundir el Fast Red ITR dentro del gel.

Para detectar las actividades de proteinasas, el gel con las proteínas de trofozoítos y quistes separadas electroforéticamente se incubó a temperatura ambiente con una solución de Tris-HCl 0.1M pH 7.4, mercaptoetanol 0.5% (v/v) durante 30 minutos. Entre tanto se preparó un gel de detección de  $14 \times 12 \times 0.075$  cm que contenía caseína (1mg/ml) y una concentración de acrilamida de 7.5% y bisacrilamida de 5%, en Tris-HCl 0.1M pH 7.4. El gel polimerizado con la caseína se incubó por 10 minutos en el amortiguador con mercaptoetanol y a continuación se puso en contacto directo con el gel de poli(acrilamida) con las proteínas separadas electroforéticamente. Se eliminaron las burbujas de aire atrapadas entre ambos geles y se presionaron el uno contra el otro de manera que se asegurara un contacto íntimo entre ambos geles. El sandwich formado se guardó en una bolsa de polietileno que contenía una toalla húmeda para mantener la humedad requerida

para que el gel no se secase. El sandwich se incubó a 37°C durante 48 horas. Después de la incubación el gel de detección se fijó en ácido tricloroacético (TCA) 12.5% (p/v) durante 24 horas. Ahora el gel de detección se tiñó con una solución de Azul de Coumassie brillante G-250 0.25% (p/v), metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) durante 24 horas y se destiñó en una solución de ácido acético al 7% (v/v), metanol 5% (v/v). Las bandas con actividad proteolítica se detectaron como zonas no teñidas por el azul de Coumassie sobre un fondo azul uniforme.

La presencia de Fe-proteínas se detectó mediante el uso de un amortiguador de electroforesis diferente del empleado en el caso de las otras electroforesis. La composición de éste fue Tris 5 mM, glicina 38 mM, pH 8.3. El extracto de la muestra para la corrida electroforética se utilizó sin la adición de azul de bromofenol. Este corrió en un carril paralelo. Una vez concluida la electroforesis el gel se incubó en una solución de acetato de sodio 0.1 M pH 5.0 durante 30 minutos, a continuación se incubó en una solución recién preparada de ácido 3,5 diaminobenzoico 80 mM, convertido al dihidrocloruro mediante la adición de HCL 0.1 N, en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5.0 conteniendo peróxido de hidrógeno 80 mM durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad. Las ferroproteínas se revelaron como bandas de color café oscuro sobre un fondo café más claro.

En todos los casos excepto para la actividad de quitinasa los geles teñidos se fotografiaron inmediatamente empleando transiluminación sobre un negatoscopio. En el caso de la actividad de quitinasa los geles se fotografiaron empleando iluminación frontal a partir de una lámpara de luz ultravioleta de onda corta.

#### IV. RESULTADOS.

El proceso de diferenciación de la amiba mediante el cual el trofozoíto se transforma en quiste es un proceso complejo, el trofozoíto muestra cambios en su movilidad y metabolismo, se forma una pared celular resistente que lo cubre en su totalidad y que le permite resistir cambios bruscos en la presión osmótica del medio que lo rodea. La mayor parte de estos cambios se debe seguramente a que durante el proceso de diferenciación de la célula vegetativa la transcripción de diversos genes se apaga mientras que en otros se enciende.

Un enfoque experimental que puede ayudar a hacer el estudio del proceso de diferenciación de la amiba es el estudio de aquellos genes cuya transcripción se enciende o se apaga durante la diferenciación. Entre las proteínas codificadas por los genes que se encienden o se apagan, las enzimas pueden estudiarse siguiendo la aparición o desaparición de sus correspondientes actividades enzimáticas. La medición directa de la actividad enzimática de cada una de las enzimas candidatas es difícil y podría no revelar el que aún sin cambios en la actividad total de estas se produjeran cambios en los patrones de isoenzimas que corresponden a cada actividad enzimática. De acuerdo con lo anterior es necesario un enfoque práctico que permita la identificación de aquellas enzimas en las que se produzcan cambios, ya sea por aparición o desaparición de la actividad enzimática o bien por cambios en la población de isoenzimas responsables de la actividad enzimática en cuestión. El estudio de la distribución electroforética de las bandas de proteínas con actividades enzimáticas relacionadas con las diferentes áreas del metabolismo es una forma práctica de

de abordar este problema. De acuerdo con lo anterior se estudió la distribución electroforética comparativa entre trofozoíto y quistes de las siguientes actividades enzimáticas: de las vías metabólicas asociadas con el metabolismo de los carbohidratos se estudiaron las enzimas hexokinasa, glucosa fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, malato deshidrogenasa descarboxilante, amilasa y quitinasa. De las enzimas hidrolíticas inespecíficas se estudiaron las esterases y las proteinasas. Respecto a las enzimas asociadas con los pasos finales del metabolismo de la glucosa se estudiaron las alcohol deshidrogenasas NADP y NAD dependientes. Como el proceso de enquistamiento requiere de un ambiente con carácter reductor se incluyó en esta investigación la detección de las bandas de ferroproteína que son proteínas que entre otras funciones participan en el metabolismo de los trofozoítos acarreado electrones en condiciones anaerobias como lo hacen las ferredoxinas, aun cuando éstas no son propiamente enzimas. Como este enfoque experimental es comparativo, una de las características más importantes que se deben mantener es que las células que se utilicen en el estudio se encuentren claramente en una de sus dos formas de diferenciación: trofozoíto o quiste. Es decir, que los trofozoítos estén creciendo activamente donde las condiciones sean óptimas para el crecimiento vegetativo para que la población de trofozoítos sea lo más homogénea posible. De manera similar, la población de quistes debe ser lo más homogénea posible respecto a su estadio de diferenciación y a la pureza del tipo de células. De acuerdo con lo anterior, se buscaron las condiciones de crecimiento vegetativo y enquistamiento más adecuadas para este fin. En los experimentos que se reportan los quistes se obtuvieron mediante la diferenciación de trofozoítos empleando el medio LGM que es un medio que ca-

rece de glucosa en comparación con el medio TYI-S-33 que es el medio de crecimiento de los trofozoítos. El estímulo de diferenciación por depresión de los niveles de glucosa es una señal que afecta el metabolismo del trofozoíto y activa el proceso de diferenciación. (Vázquez de Lara y Arroyo, 1984). La población de trofozoítos que se obtuvo fue muy homogénea debido a que los trofozoítos no enquistan espontáneamente en el medio de crecimiento TYI-S-33. En los experimentos que se reportan se empleó como criterio de enquistamiento la presencia de pared celular en las amibas. El colorante Calcofluor white M2r emite fluorescencia intensa en la presencia de ésta, lo cual permite su detección. Este es un criterio adecuado de diferenciación puesto que la formación de pared celular es un rasgo esencial de la formación del quiste, ya que al ser iluminada la población de células enquistantes con la luz ultravioleta los quistes pueden distinguirse fácilmente de los trofozoítos porque muestran un halo azul producto de la fluorescencia del complejo Calcofluor-quitina en la pared del quiste. En contraste, los trofozoítos permanecen sin teñir ya que carecen de pared celular. En general, en los experimentos de enquistamiento se obtuvieron poblaciones celulares con predominancia de quistes. Los quistes se purificaron por sedimentación diferencial en gradientes de Percoll. En el gradiente de Percoll los trofozoítos migran al fondo del tubo mientras que los quistes permanecen en suspensión en la zona del gradiente entre 30-50% de Percoll. En la tabla II se muestran las características de las poblaciones celulares empleadas. El porcentaje de enquistamiento de los cultivos de E. invadens IP-1 fue de 75-85%, a juzgar por las células Calcofluor positivas observadas. Después de la purificación de estas células en el gradiente de Percoll la población de células Calcofluor positivas se incrementó a más de 90%. En los experimentos que se reportan so-

Tabla II. Porcentaje de enquistamiento y purificación de quistes de

E. invadens IP-1.

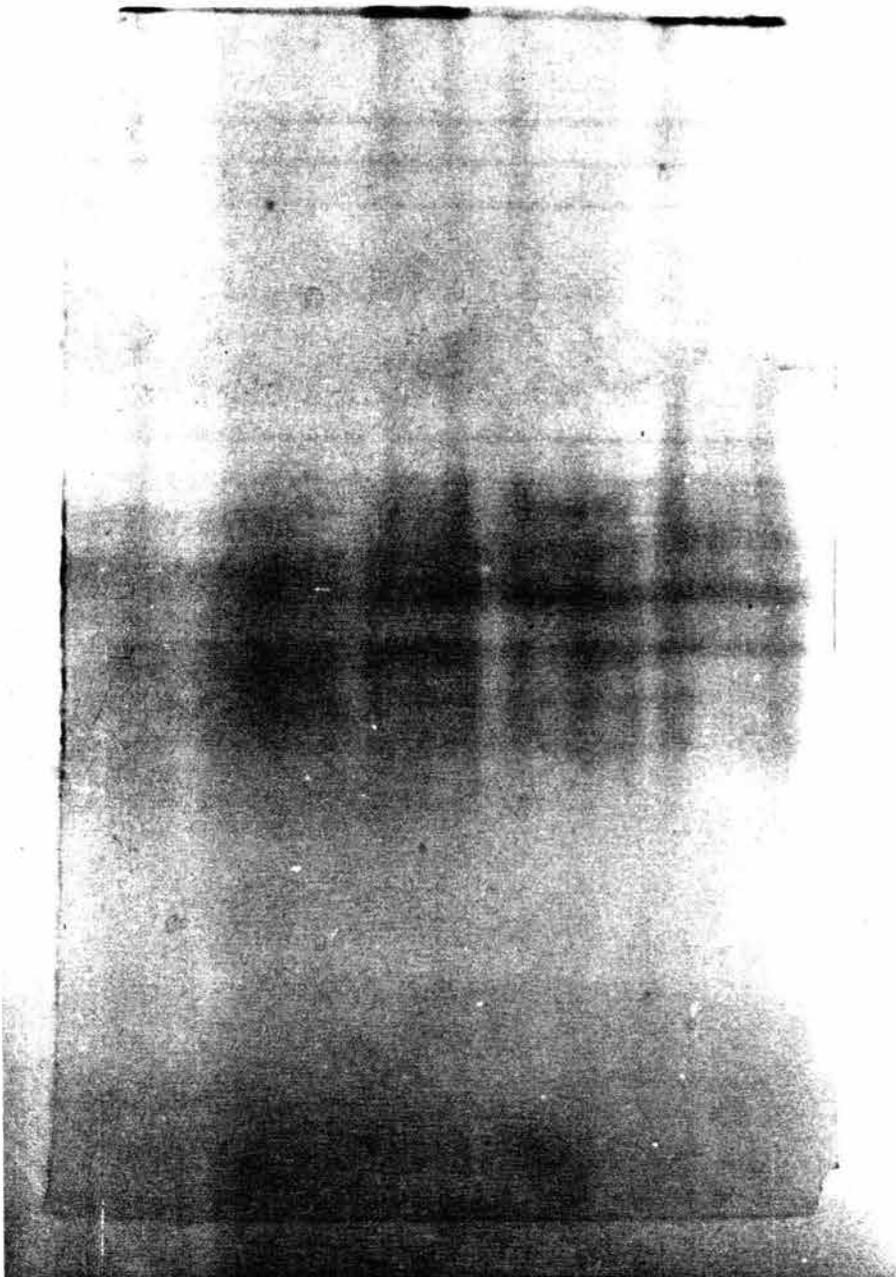
No de amibas del lote	Celulas Calcofluor positivas (quistes contados)	Celulas Calcofluor negativas (trofozoítos contados).	% quistes antes de la purificación en Percoll	% quistes despues de la purificación en Percoll.
18x10 <sup>6</sup>	1107	36	36/1107(96%)	más de 96%
400x10 <sup>6</sup>	1184	209	209/1652(82%)	*
252x10 <sup>6</sup>	2133	264	264/2133(88%)	*
102x10 <sup>6</sup>	913	462	462/913(50%)	No incluida en la electroforesis
250x10 <sup>6</sup>	468	49	49/468(90%)	*

Trofozoítos de E. invadens IP-1 se enquistaron en medio de cultivo TYI-S-33 sin glucosa, los quistes producidos mediante este procedimiento se cuantificaron mediante su estimación en el microscopio de fluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Los quistes se separaron de los trofozoítos mediante centrifugación diferencial como se describe en Materiales y Métodos. \*. No determinado.

lo se emplearon aquéllos cultivos con porcentajes de enquistamiento 70% o mayores. Esto con objeto de asegurar una población lo más homogénea posible en respecto a su estadio de diferenciación. Solo los cultivos en crecimiento activo enquistaron en alto porcentaje. El empleo de nitrógeno líquido como refrigerante para el almacenaje de las células o sus extractos permitió preservar la actividad de las enzimas ensayadas en óptimas condiciones. Se trató en lo posible de someter el extracto de quistes y trofozoítos a un proceso de extracción igual para minimizar diferencias producidas por manipulación. El sistema de electroforesis que se empleó usando geles de poliacrilamida tiene ventajas con respecto a los geles de almidón, tanto en términos de tiempo de electroforesis como respecto al calentamiento de los geles durante la electroforesis de las enzimas. Para la electroforesis el contenido de proteína de los lotes de proteína empleados fueron: 1250 µg/ml de extracto de trofozoítos y de 700 µg/ml de extracto de quiste. La cantidad de proteína por ml en los extractos de quistes fue menor siempre que la cantidad de proteína en los extractos de los trofozoítos. Sin embargo, se aseguró que la cantidad total de proteína en las muestras para electroforesis de extractos de quistes y trofozoítos fuera la misma.

En la figura 2 se muestra el patrón electroforético en acrilamida al 7.5% de las proteínas de los trofozoítos y quistes de E. invadens IP-1 teñido para la actividad de hexokinasa. Los carriles marcados con la letra Q corresponden a carriles donde corrieron los extractos de quistes. Los carriles marcados con la letra T corresponden a carriles donde corrieron los extractos de trofozoítos. Tanto en los trofozoítos como en los quistes se pudo detectar la actividad de hexokinasa. La zona de actividad de la hexokinasa se observó localizada en la región media del gel. En el carril

Figura 2. Fotografía que muestra un gel de poliacrilamida de 7.5% de concentración final de acrilamida donde se corrieron electroforéticamente extractos de trofozoítos y quistes de E. invadens IP-1. Las muestras corrieron lado a lado con objeto de minimizar variaciones cada carril tuvo cantidades iguales de proteína (50 µg). Los geles se sumergieron en una solución de 30 ml compuesta de Tris-HCl 0.2M pH 7.4, NADP  $3 \times 10^{-4}$ M, glucosa  $1.1 \times 10^{-1}$ M, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de levadura 1U/ml, MgCl<sub>2</sub> 0.01M, MTT  $5 \times 10^{-4}$ M, ATP  $1 \times 10^{-3}$ M, con objeto de revelar la actividad de la enzima hexokinasa. El gel se incubó a temperatura ambiente en la obscuridad el tiempo suficiente para que las bandas fueran claramente visibles. Abreviaturas T. trofozoíto. Q. quiste.



111

Q T Q T Q

De los trofozoítos se tiñeron 3 bandas de actividad con Rf de 0.46, 0.50, y 0.54. En los carriles donde migró el extracto correspondiente a los quistes se detectaron las mismas bandas de actividad. Debido a que la sobre-tinción fue un problema frecuente, los geles solo se tiñeron 5-10 minutos a temperatura ambiente para obtener detecciones enzimáticas satisfactorias de hexokinasa.

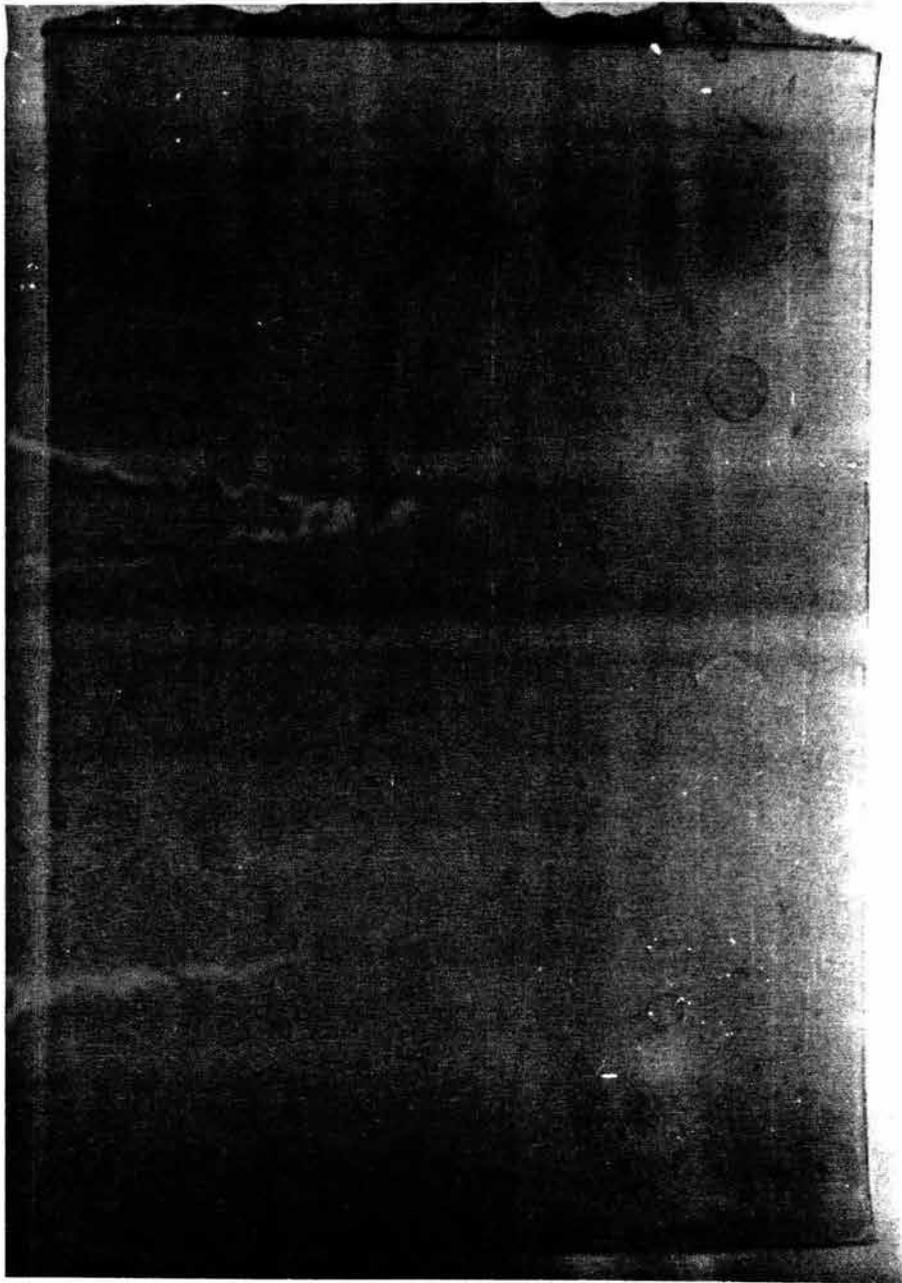
En la figura 3 se muestra un gel de poliacrilamida al 7.5% que se tiñó para detectar la actividad de la enzima glucosa fosfato isomerasa. Los carriles marcados con la letra Q corresponden a carriles donde corrieron proteínas del extracto de quistes, los carriles marcados con la letra T corresponden a carriles donde corrieron proteínas del extracto de trofozoítos. Tanto en quistes como en trofozoítos se detectó la actividad de glucosa fosfato isomerasa en una sola banda de actividad con idéntico patrón de migración e intensidad de tinción. La enzima migró relativamente poco en el gel y tuvo un Rf de 0.14.

La figura 4 muestra un gel de poliacrilamida al 7.5% que se tiñó para la actividad de malato deshidrogenasa descarboxilante. Los carriles marcados con la letra Q corresponden a carriles donde corrieron proteínas del extracto de quistes, mientras los carriles marcados con la letra T corresponden a carriles donde corrieron proteínas con el extracto de trofozoítos.

La actividad de malato deshidrogenasa se tiñó como una banda teñida tenuemente con un Rf de 0.16. Esta banda estuvo presente tanto en quistes como en trofozoítos y fue idéntica en intensidad y migración dentro del gel.

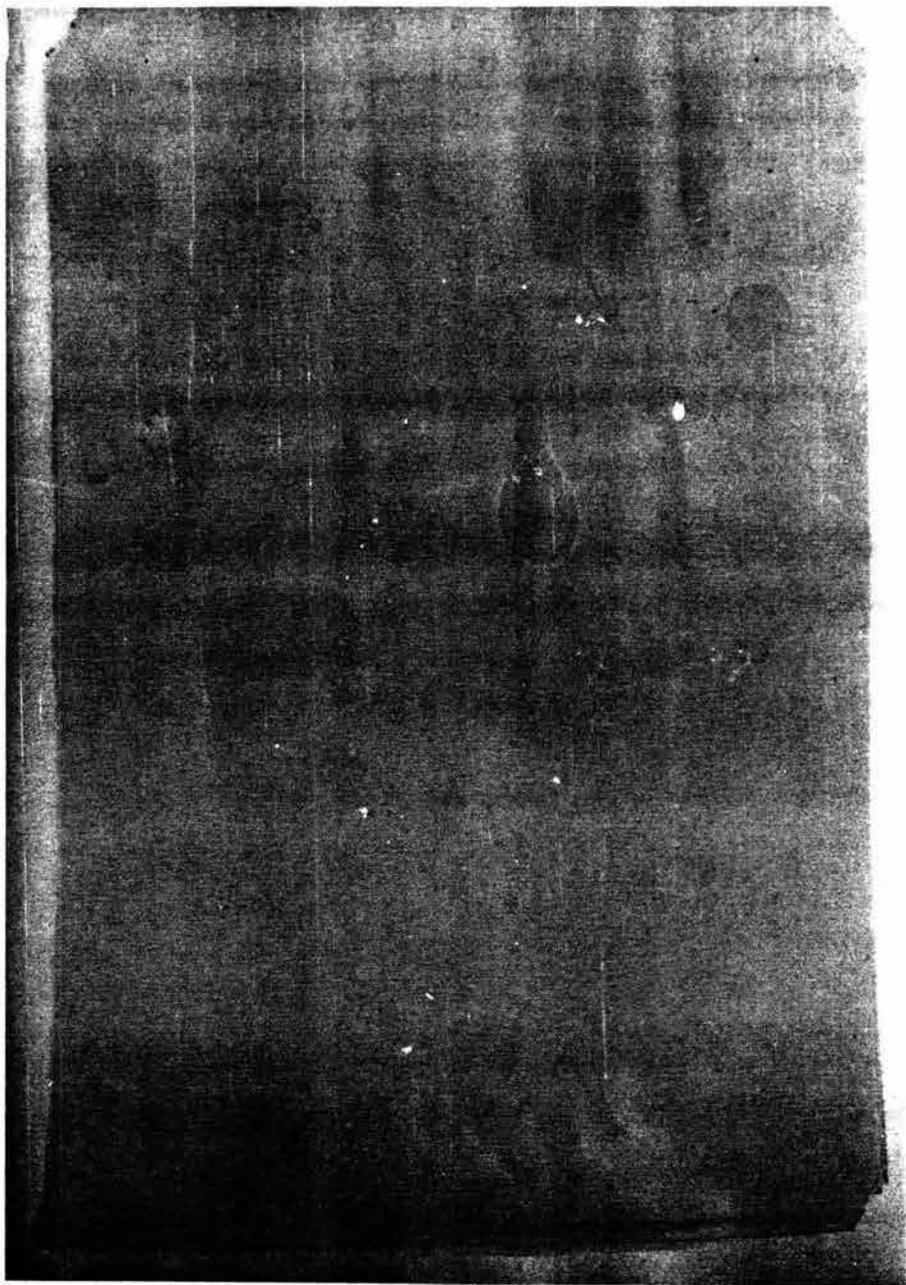
En la figura 5 se muestra un gel de poliacrilamida que se tiñó para detectar la actividad de fosfoglucomutasa, los carriles marcados con la letra Q corresponden a carriles donde corrieron proteínas del extracto de quistes. Los carriles marcados con la letra T correspondieron a

Figura 3. Fotografía que muestra un gel de poliacrilamida de 7.5% de concentración final de acrilamida donde corrieron electroforéticamente extractos de trofozoítos y quistes de E. invadens IP-1. Las muestras corrieron lado a lado con objeto de minimizar variaciones. Cada carril tuvo cantidades iguales de proteína (50µg). Los geles se sumergieron en 30 ml de la solución compuesta por Tris-HCl 0.2M pH 8.0, NADP  $3 \times 10^{-4}$ M, fructosa 6-fosfato  $1 \times 10^{-4}$ M, 2 U/ml de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de levadura, MgCl<sub>2</sub> 0.01M, MTT  $5 \times 10^{-4}$ M, PMS  $1 \times 10^{-4}$ M. Con objeto de revelar la actividad de la enzima glucosa fosfato isomerasa. El gel se incubó a 37°C en la oscuridad el tiempo suficiente para que las bandas de actividad fueran claramente visibles. Abreviaturas. T. trofozoíto. Q. quiste.



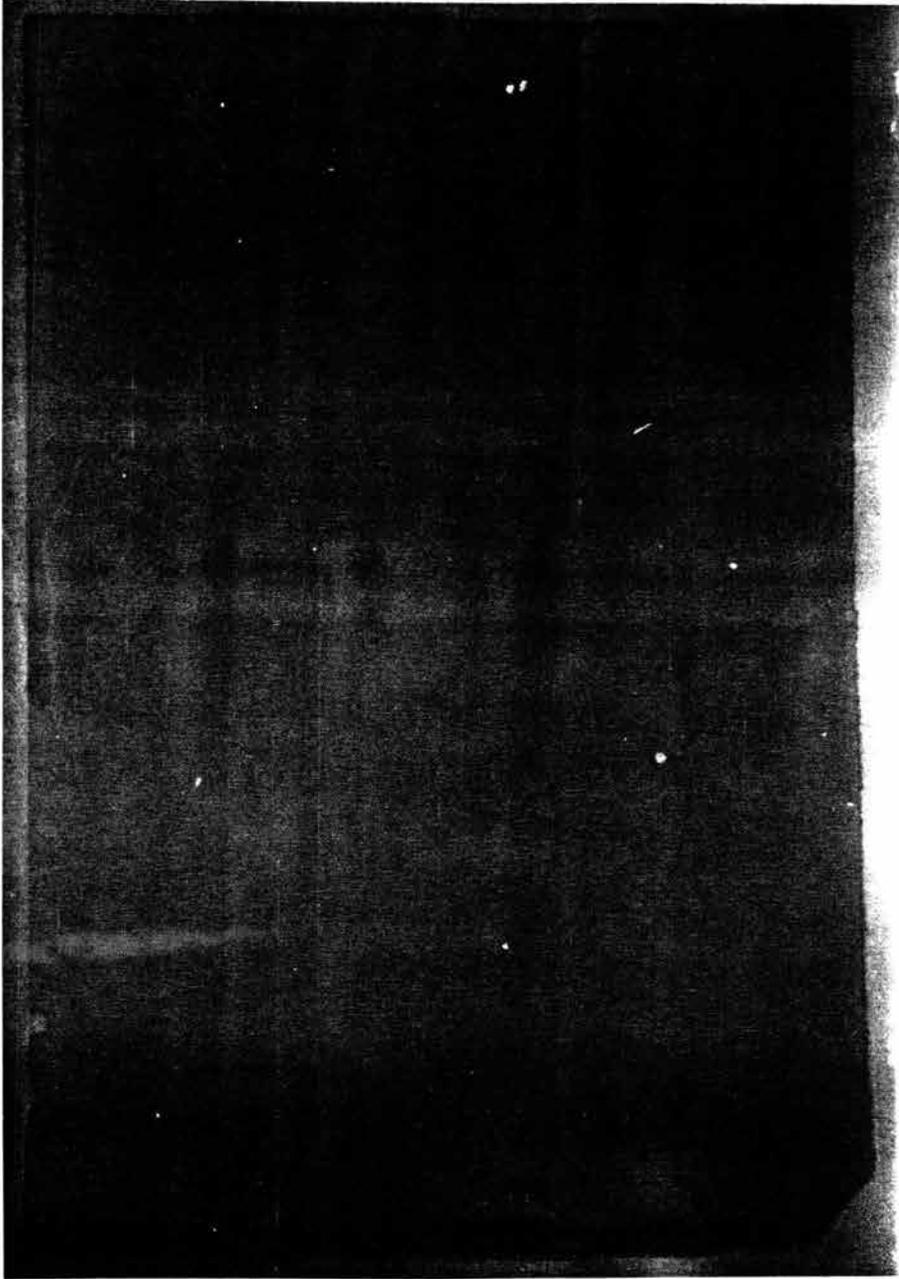
T Q T Q T

Figura 4. Fotografía que muestra un gel de poliacrilamida al 7.5% de concentración final de acrilamida donde corrieron electroforéticamente extractos de trofozoítos y quistes de E. invadens IP-1. Las muestras corrieron lado a lado con objeto de minimizar variaciones. Cada carril tuvo cantidades iguales de proteína (50µg). Los geles se sumergieron en 30 ml de una solución compuesta de Tris-HCl 0.2M pH 7.4, NADP  $3 \times 10^{-4}$ M, ácido maleico 0.03M ajustada previamente a pH 7.0 con NaOH 0.1N, MgCl<sub>2</sub> 0.01M, MTT  $5 \times 10^{-4}$ M, PMS  $1 \times 10^{-4}$ M., con objeto de revelar la actividad de la enzima malato deshidrogenasa descarboxilante. El gel se incubó a 37°C en la obscuridad el tiempo suficiente para que las bandas de actividad fueran claramente visibles. Abreviaturas. T. trofozoíto. Q. quiste.



Q T Q T Q

Figura 5. Fotografía que muestra un gel de poliacrilamida al 7.5% de concentración final de acrilamida donde se corrieron electroforéticamente extractos de trofozoítos y quistes de E. invadens IP-1. Las muestras corrieron lado a lado con objeto de minimizar variaciones. Cada carril tuvo cantidades iguales de proteína (50ug). Los geles se incubaron en 30 ml de una solución compuesta de Tris-HCl 0.2M pH 7.4, NADP  $3 \times 10^{-4}M$ , glucosa 1-fosfato  $6.6 \times 10^{-3}M$ , 0.4 U/ml de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de levadura,  $MgCl_2$  0.01M, MTT  $5 \times 10^{-4}M$ , PMS,  $1 \times 10^{-4}M$ ., con objeto de detectar las bandas con actividad de fosfoglucomutasa. El gel se incubó en la obscuridad a 37°C el tiempo suficiente para que las bandas fueran claramente visibles. Abreviaturas. T Trofozoíto. Q. quiste.



T Q T Q T

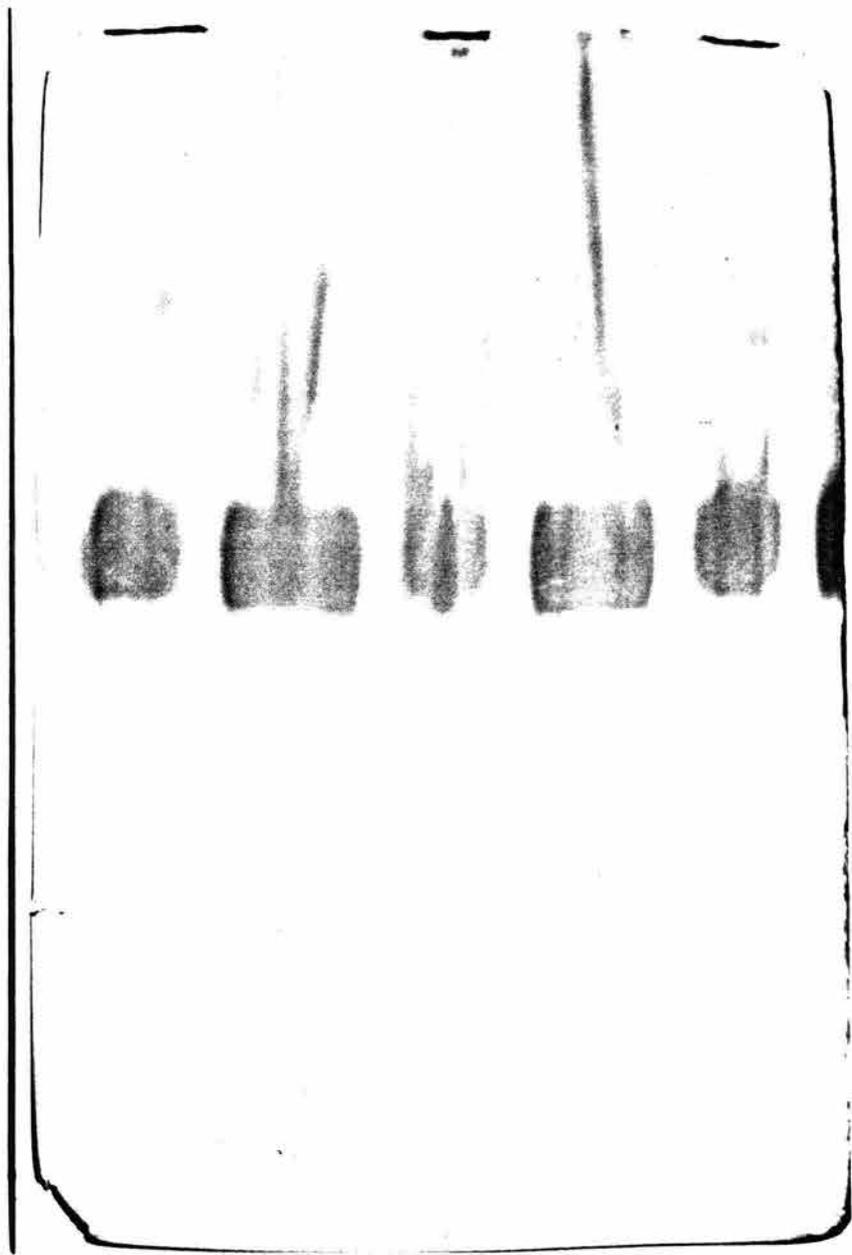
carriles donde corrieron las proteínas del extracto de trofozoítos. La tinción para esta actividad reveló escasa actividad enzimática. La enzima tuvo un  $R_f$  de 0.15. La actividad enzimática fue idéntica en trofozoítos y quistes en términos de su migración electroforética e intensidad.

La figura 6 muestra un gel de poliacrilamida que se tiñó para la actividad de alcohol deshidrogenasa NADP dependiente. Los carriles marcados con Q corresponden a carriles donde migraron las proteínas del extracto de quistes. Los carriles marcados con la letra T corresponden a carriles donde migraron proteínas del extracto de trofozoítos. Tanto en trofozoítos como en quistes se pudo detectar una zona muy evidente de actividad de alcohol deshidrogenasa NADP dependiente que migró en la región media del gel con  $R_f$  de 0.43. Esta banda fue idéntica tanto respecto a su patrón de migración como a su intensidad en trofozoítos y quistes. Debido a la actividad de la enzima, la sobretinción fue un problema frecuente. 5-10 minutos de incubación a temperatura ambiente o  $37^{\circ}\text{C}$  con el sistema detector de la enzima fue suficiente.

En la figura 7 se muestra un gel de poliacrilamida que se tiñó para la actividad de alcohol deshidrogenasa NAD dependiente, los carriles marcados con la letra Q corresponden a carriles donde corrieron proteínas del extracto de quistes. Los carriles marcados con la letra T corresponden a carriles donde corrieron proteínas del extracto de trofozoítos. Se detectó tanto en quistes como en trofozoítos una sola banda de actividad que migró en la región media del gel con  $R_f$  de 0.40. Esta banda fue idéntica en ambas preparaciones.

En la figura 8 se muestra un gel de poliacrilamida que se tiñó para la actividad de amilasa, los carriles marcados con la letra Q corresponden a los carriles donde corrieron las proteínas con el extracto de quistes. Los carriles con

Figura 6. Fotografía que muestra un gel de poliacrilamida al 7.5% de concentración final de acrilamida donde corrieron electroforéticamente extractos de trofozoítos y quistes de E. invadens IP-1. Las muestras corrieron lado a lado con objeto de minimizar variaciones. Cada carril tuvo cantidades iguales de proteína (50µg). Los geles se sumergieron en 30 ml de una solución compuesta de amortiguador de fosfato 0.1M pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 0.01M, MTT 6x10<sup>-4</sup>M, PMS 3x10<sup>-4</sup>M isopropanol 10%(v/v), NADP 7x10<sup>-4</sup>M., con objeto de revelar la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa NADP dependiente. El gel se incubó a temperatura ambiente en la obscuridad el tiempo suficiente para que las bandas de actividad fueran claramente visibles. Abreviaturas T. trofozoíto. Q. quiste.



Q

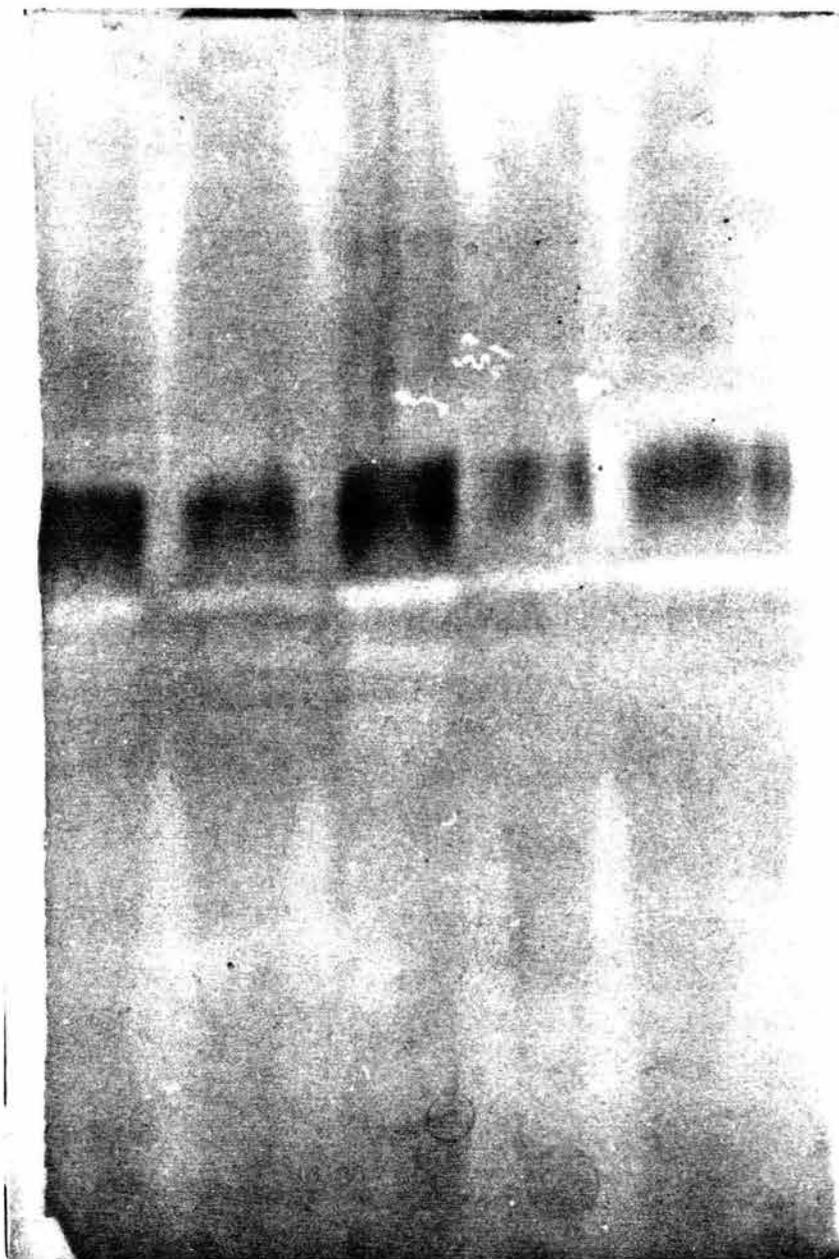
T

Q

T

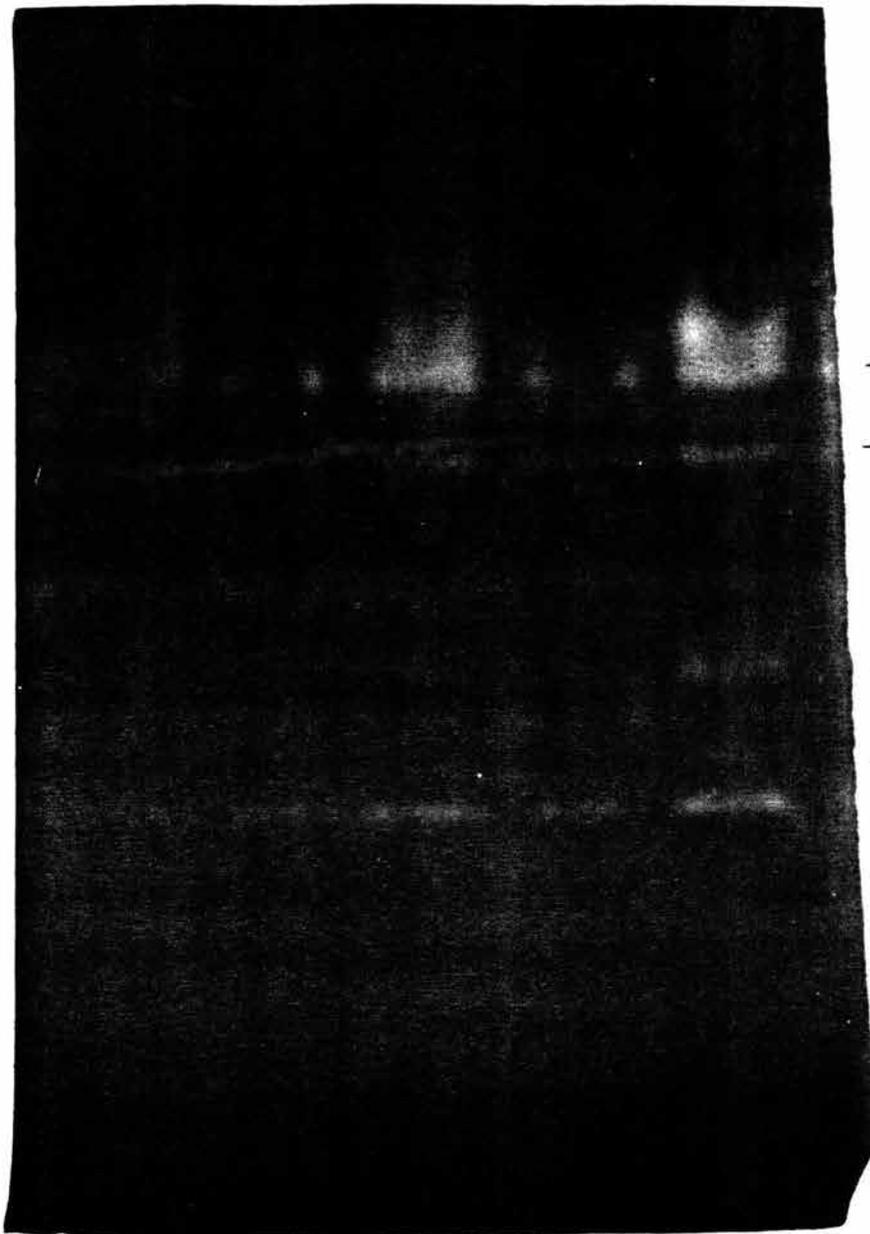
Q

Figura 7. Fotografía que muestra un gel de poliacrilamida al 7.5% de concentración final de acrilamida donde se corrieron electroforéticamente extractos de trofozoítos y quistes de E. invadens IP-1. Las muestras corrieron lado a lado con objeto de minimizar variaciones, cada carril tuvo cantidades iguales de proteínas (50ug). Los geles se sumergieron en 30 ml de una solución compuesta de amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 0.01M, MTT 6x10<sup>-4</sup>M, PMS 3x10<sup>-4</sup>M, isopropanol 10%(v/v), NAD 7x10<sup>-4</sup>M, con objeto de revelar la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa NAD dependiente. El gel se incubó a 37°C el tiempo suficiente para que las bandas de actividad fueran claramente visibles. Abreviaturas. T. trofozoito. Q. quiste.



T Q T Q T

Figura 8. Fotografía que muestra un gel de poliacrilamida de 7.5% de concentración final de acrilamida donde se corrieron electroforéticamente extractos de trofozoítos y quistes de E. invadens IP-1. Las muestras corrieron lado a lado con objeto de minimizar variaciones. Cada carril tuvo cantidades iguales de proteína (100 µg). Los geles se sumergieron en una solución de 100 ml compuesta de amortiguador de fosfatos 0.1M pH 6.4, NaCl 0.015M, azida de sodio 0.001M, almidón soluble al 0.1%(p/v), durante 1-2 horas a 37°C. Para revelar la actividad de la enzima amilasa los geles se lavaron e incubaron en una solución de yodo 1%(p/v)-yoduro de potasio 3%(p/v). Los geles se lavaron hasta que las bandas de actividad fueran claramente visibles por tinción negativa. Abreviaturas. T. trofozoíto. Q. quiste.



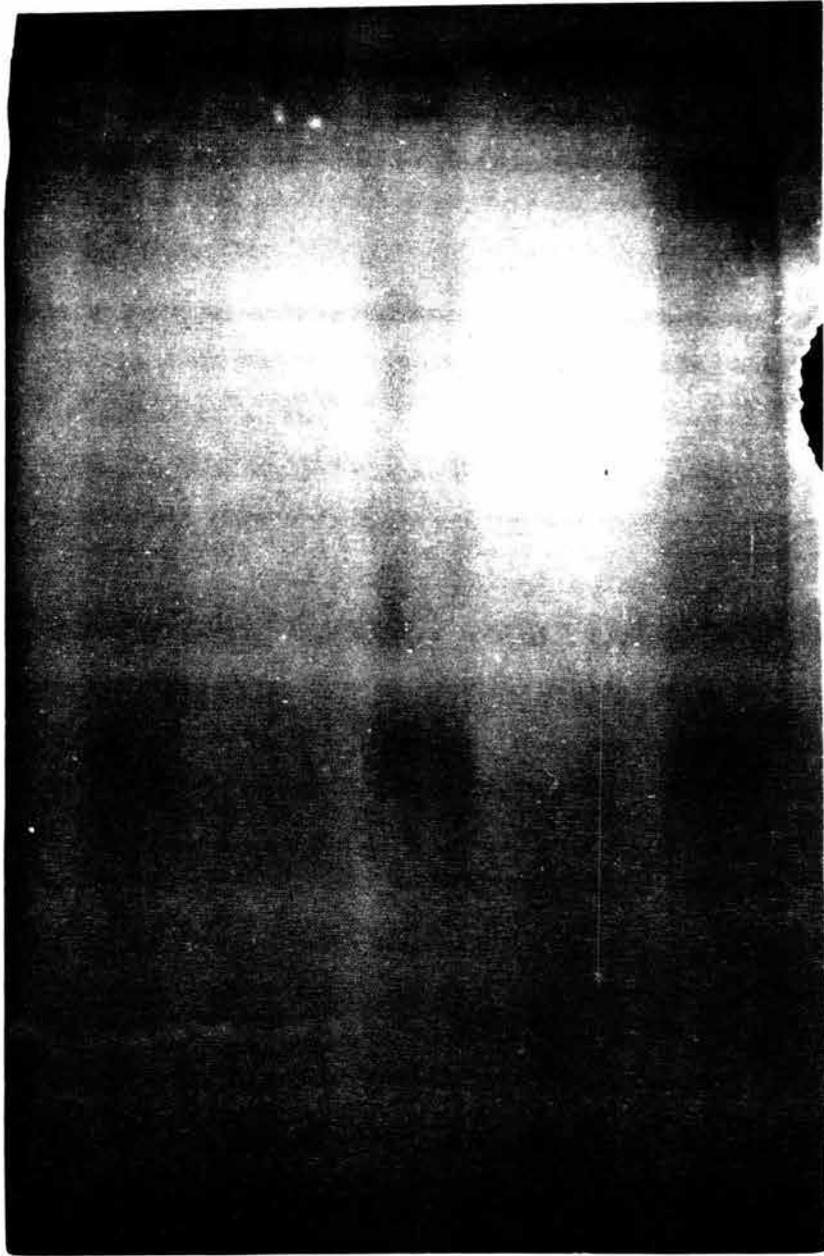
I  
II  
III  
IV  
V

T Q T Q T

la letra T corresponden a aquellos donde corrieron proteínas del extracto de trofozoítos. Se detectaron 5 variantes electroforéticas de las amilasas en los trofozoítos con Rf de 0.30, 0.37, 0.54, 0.61, 0.66. Las diferentes bandas se identificaron con los números romanos del I-V. La amilasa I fue la que migró menos en el sistema de electroforesis. Esta banda presentó una actividad mayor que las restantes isoenzimas que se separaron. En los carriles donde corrieron las proteínas del extracto de quistes se detectó un conjunto de isoenzimas de amilasa similar, sin embargo hubo características distintivas. La amilasa I tuvo menor actividad a juzgar por el halo de hidrólisis, las amilasas I, II y V fueron idénticas tanto en trofozoítos como en quistes respecto a su Rf y halo de hidrólisis. En cambio las amilasas III y IV se encontraron seriamente deprimidas en los extractos de quistes y su actividad no fue detectable en nuestras condiciones de ensayo, señalando diferencias entre el patrón isoenzimático de los quistes y de los trofozoítos.

En la figura 9 se muestra un gel de poliacrilamida que se tiñó para la actividad de quitinasa, los carriles marcados con la letra Q corresponden a aquellas regiones del gel de detección que estuvieron en contacto directo con los carriles del gel donde corrieron las proteínas del extracto de quistes. Los carriles marcados con T corresponden a regiones del gel de detección que estuvo en contacto directo con los carriles del gel donde corrió el extracto de trofozoítos. Se detectó una banda de actividad de quitinasa bien definida en los extractos de quistes que migró más allá de la región media del gel de detección y algunas otras bandas de actividad de quitinasa no bien definidas. El Rf de la banda más importante fue 0.60. En cambio en los carriles donde corrieron las proteínas del extracto de trofozoítos la actividad de quitinasa fue

Figura 9. Fotografía que muestra un gel de poliacrilamida al 7.5% de concentración final de acrilamida conteniendo glicol-quitina 0.02%(v/v), Tris-HCl 0.1 M pH 7.4. que estuvo en contacto directo con un gel de poliacrilamida de 7.5% de concentración final de acrilamida donde corrieron electroforéticamente extractos de trofozoítos y quistes de E. invadens IP-1. Las muestras corrieron lado a lado con objeto de minimizar variaciones. Cada carril tuvo cantidades iguales de proteína (100 µg). El gel de detección estuvo en contacto directo con el gel con las proteínas separadas de E. invadens durante 18 h a 37°C. dentro de una bolsa de polietileno en condiciones húmedas. La actividad de la enzima quitinasa en el gel de prueba se detectó mediante su incubación en una solución de Calcofluor White M2r 0.01%(p/v) en Tris-HCl 0.5M pH 8.9 durante 6 minutos y se enjuagó en agua destilada durante una hora. Los geles se iluminaron con luz UV. Las zonas de actividad de quitinasa fueron aquéllas carentes de fluorescencia del complejo Calcofluor quitina en el gel de detección.



-

Q T Q T Q

débil. Esto indica diferencias significativas en la actividad de quitinasa entre quistes y trofozoítos.

En la figura 10 se muestra un gel de detección que se tiñó para la actividad de proteinasas. los carriles marcados con la letra Q corresponden a regiones del gel de detección que estuvieron en contacto directo con los carriles donde corrieron las proteínas del extracto de quistes. Los carriles marcados con la letra T corresponden a regiones del gel de detección que estuvieron en contacto directo con los carriles donde corrieron las proteínas del extracto de trofozoítos. En los carriles de los trofozoítos se pudieron detectar 3 proteinasas. Las diferentes bandas se identificaron con los números romanos I-III. Estas bandas mostraron los siguientes valores de  $R_f$ , 0.29, 0.48, 0.64.. La proteinasa II con movilidad electroforética intermedia fue la de mayor actividad proteolítica. En contraste con la intensa actividad proteolítica de los extractos de los trofozoítos, los extractos de quistes presentaron una actividad proteolítica difícilmente detectable indicando diferencias estadio específicas.

En la figura 11 se muestra un gel de poliacrilamida que se tiñó para la actividad de esterasa, los carriles marcados con la letra Q corresponden a aquellos donde corrieron proteínas del extracto de quistes. Los carriles marcados con la letra T corresponden a aquellos donde corrieron proteínas del extracto de trofozoítos. Se detectaron tanto en los quistes como en los trofozoítos dos bandas de actividad intensa de esterasa. Las bandas se identificaron con los números romanos I y II. La esterasa I tuvo un  $R_f$  de 0.34 y la esterasa II tuvo un  $R_f$  de 0.65. Ambas esterases estuvieron presentes tanto en trofozoítos como en quistes y fueron idénticas. En los carriles de los trofozoítos se notó la presencia de algunas bandas con actividad de esterasa de menor intensidad, en los carriles de los quistes no se pudieron

Figura 10. Fotografía que muestra un gel de poliacrilamida al 7.5% de concentración final de acrilamida conteniendo caseína 1mg/ml en tris-HCl 0.1M pH 7.4 e incubada previamente 30 minutos en buffer de la misma formulación conteniendo mercaptoetanol 0.5%(v/v) que estuvo en contacto directo con un gel de poliacrilamida de 7.5% de concentración final de acrilamida donde corrieron electroforéticamente extractos de trofozoítos y quistes de E.invadens IP-1. Las muestras corrieron lado a lado con objeto de minimizar variaciones. Cada carril tuvo cantidades iguales de proteína(100µg). El gel de detección estuvo en contacto directo con el gel con las proteínas separadas de trofozoítos y quistes de E.invadens durante 48 h a 37°C. Después de la incubación el gel de detección se fijó en TCA y se tiñó con azul de Coumassie brillante. Las zonas de actividad de las enzimas proteolíticas se detectaron como zonas blancas sobre un fondo azul de proteína intacta. Abreviaturas. T. trofozoíto, Q. quiste.



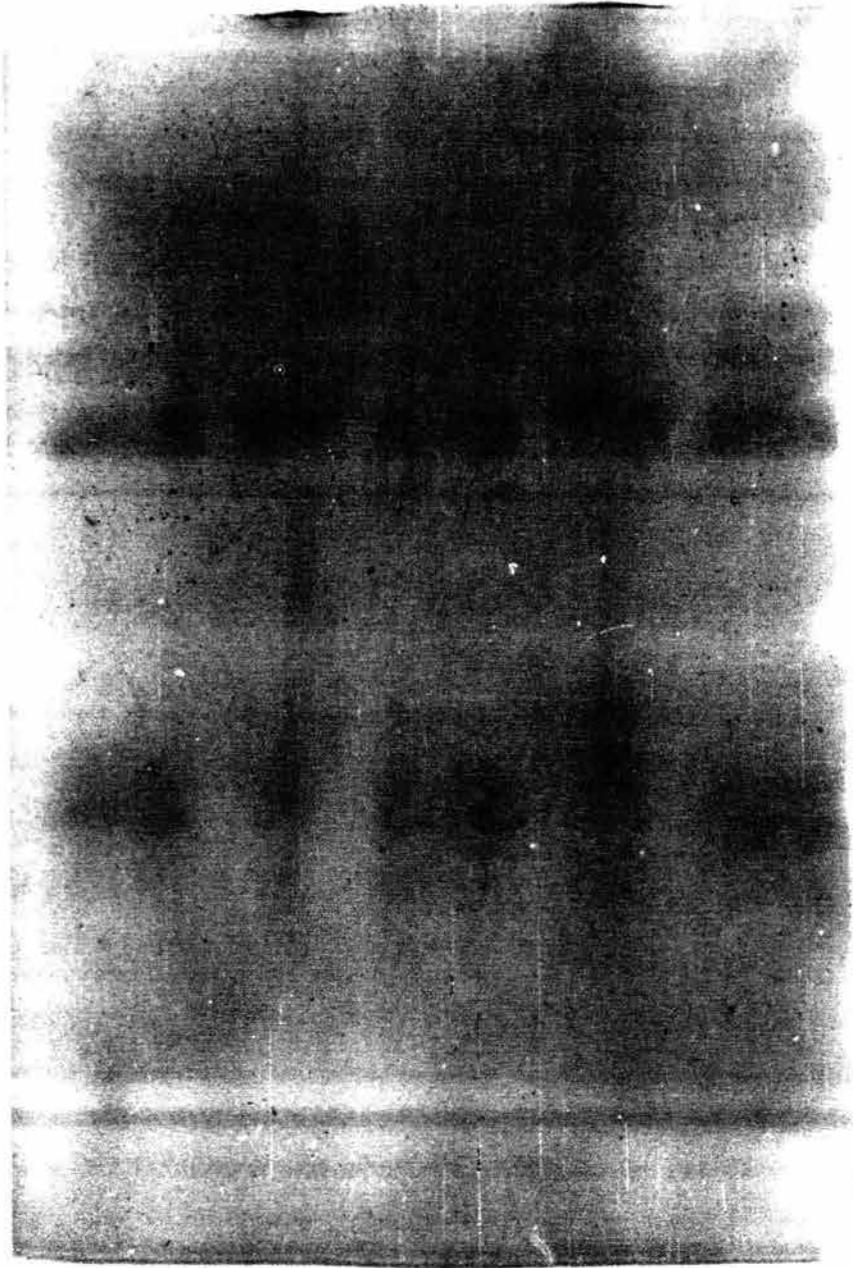
T

T

T

T Q T Q T

Figura 11. Fotografía que muestra un gel de poliacrilamida de 7.5% de concentración final de acrilamida donde corrieron electroforéticamente los extractos de trofozoítos y quistes de E. invadens IP-1. Las muestras corrieron lado a lado con objeto de minimizar variaciones. Cada carril tuvo cantidades iguales de proteína (100µg). Los geles se sumergieron en una solución de 50 ml compuesta de a-naftíil acetato  $2 \times 10^{-3}M$ , acetona 2%(v/v), en amortiguador de fosfato 0.1M pH 7.5 durante 1-1.5 h a 37°C. La actividad de la enzima esterasa se reveló por el lavado del gel e inmersión de éste en una solución de Fast Red ITR sal  $8 \times 10^{-3}M$ , en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.3. Los geles se incubaron en esta solución a temperatura ambiente hasta que las bandas fueron claramente visibles. Abreviaturas. T. trofozoíto. Q. quíste.



-I

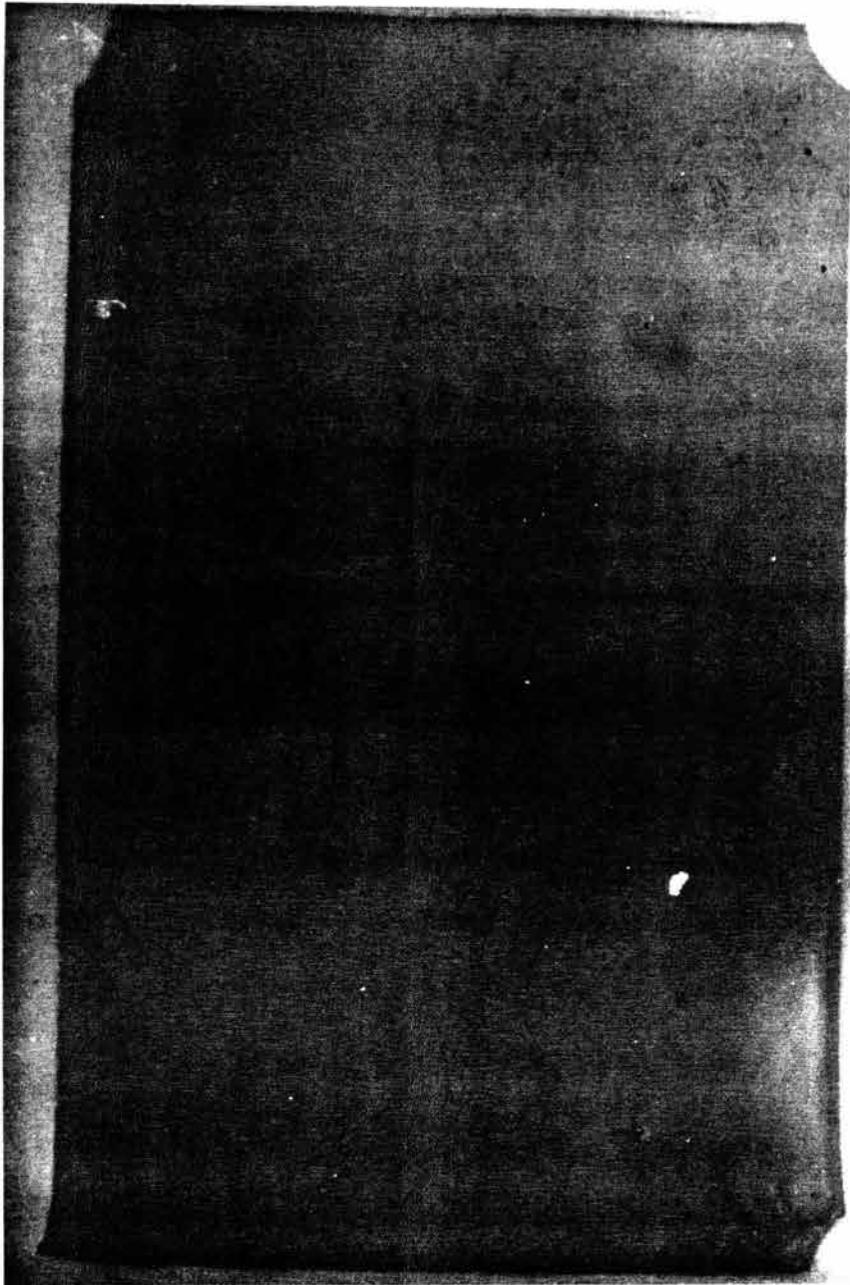
-II

T Q T Q T

identificar estas bandas.

La figura 12 muestra un gel de poliacrilamida que se tiñó para detectar las ferroproteínas de E. invadens IP-1, los carriles marcados con la letra Q corresponden a carriles donde migraron las proteínas del extracto de quistes. Los carriles marcados con la letra T corresponden a carriles donde corrieron extractos de trofozoítos. Se detectó tanto en los quistes como en los trofozoítos dos bandas de ferroproteínas que se tiñeron débilmente. Las bandas se identificaron con los números romanos I y II. En los trofozoítos las bandas mostraron mayor intensidad. La banda de la Fe- proteína I exhibió un Rf de 0.25 . La Banda de la Fe-proteína II migró con el frente del gel en la corrida electroforética. No se detectaron diferencias entre el patrón electroforético de quistes y trofozoítos para estas proteínas .

Figura 12. Fotografía que muestra un gel de poliacrilamida al 7.5% de concentración final de acrilamida donde corrieron electroforéticamente los extractos de trofozoítos y quistes de E. invadens IP-1. Las muestras corrieron lado a lado con objeto de minimizar variaciones. Cada carril tuvo cantidades iguales de proteína (100 µg). Los geles se sumergieron en una solución de acetato de sodio 0.1M pH 5.0 durante 30 minutos y luego en una solución recién preparada de ácido 3,5 diaminobenzoico 80mM en amortiguador de acetatos 0.1M pH 5.0 los geles se incubaron a 35°C en la oscuridad el tiempo suficiente para que las bandas de ferròproteínas fueran claramente visibles. Abreviaturas. T. trofozoíto. Q. quiste.



- I

- II

Q T Q T Q

## V) DISCUSIÓN.

El estudio de isoenzimas en los estadios de trofozoíto y quiste dentro del ciclo de vida del parásito E. invadens dio resultados que sugieren que durante la diferenciación de la amiba existe modificación de los patrones de isoenzimas y probablemente de las actividades enzimáticas en algunas áreas del metabolismo del parásito mientras que en otras áreas no se registró variación. Se analizaron algunas enzimas que participan en el metabolismo de los carbohidratos y no se encontró variación en la intensidad de actividad enzimática o en el número de isoenzimas o en el patrón electroforético de las enzimas glucolíticas hexokinasa, glucosa fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa y malato deshidrogenasa cuyos patrones de corrimiento electroforético resultaron idénticos en preparaciones tanto de trofozoítos como de quistes. De los pasos finales de la vía de la degradación de la glucosa se estudiaron las enzimas alcohol deshidrogenasa NADP dependiente y alcohol deshidrogenasa NAD dependiente. Los resultados obtenidos en los experimentos que se reportan no reflejan diferencias en el patrón de migración o número de isoenzimas de los trofozoítos y los quistes lo que indica que probablemente no hay variación de estas enzimas durante el enquistamiento. Tomados en conjunto estos resultados sugieren que al menos en términos cualitativos las enzimas de la glucólisis de E. invadens permanecen sin modificación durante el enquistamiento. Sin embargo las isoenzimas con actividad de amilasa mostraron modificaciones evidentes en el patrón electroforético entre trofozoítos y quistes. Se observó una desaparición detectable, bajo las condiciones de ensayo que reportamos, en los quistes de dos de las cinco isoenzimas presentes en los

trofozoítos. Anteriormente se han descrito amilasas en trofozoítos de E. histolytica y E. invadens (Werries y Nebinger, 1984, Werries y Müller, 1986). Estas enzimas juegan un papel muy importante en la nutrición de los trofozoítos en un medio donde el almidón es ampliamente disponible a partir de la dieta del huésped y es acumulado por los trofozoítos. Se ha descrito la exocitosis de amilasas en E. histolytica (Müller y col., 1988), lo que sugiere que al menos algunas amilasas del parásito tienen el papel de hidrolizar el almidón externamente y hacer la glucosa accesible al trofozoíto. Interpretamos los resultados obtenidos sugiriendo que en el quiste las amilasas no identificables pudieran ser amilasas exportables que disminuyen sus niveles o cuya síntesis se reprime o deprime debido a que los quistes no exportan amilasa al medio.

Asociados también con el metabolismo de los carbohidratos los resultados obtenidos con el estudio comparativo de quitinasas de trofozoítos y quistes de E. invadens muestran datos que sugieren un notable incremento y/o aparición de quitinasa no detectable en los trofozoítos bajo las condiciones de ensayo empleadas. En ambos, trofozoítos y quistes, se detectó actividad de quitinasa. Sin embargo bajo las mismas condiciones experimentales la quitinasa presente en los extractos de quistes fue más activa que en los trofozoítos sobre el substrato glicol-quitina. Interpretamos estos resultados como un incremento de la actividad o síntesis de quitinasa asociada con el proceso de enquistamiento. Durante el enquistamiento es probable que exista un aumento de la síntesis de quitina debido a que se forma la pared celular del quiste. Nuestros datos sugieren que también hay un incremento de actividad de quitinasa en los quistes..

Anteriormente se ha descrito la aparición de una importante actividad de

quitinasa de los trofozoítos enquistantes (Ramírez-Rojas y Arroyo, 1982).

El patrón de quitinasas detectable en los geles de poliacrilamida es compatible con esta observación.

Estudiamos dos actividades hidrolíticas inespecíficas: La actividad de esterasa y la actividad de proteínasa de los extractos de quistes de trofozoítos y quistes de E. invadens. Las proteinasas han sido descritas como factores de virulencia de los trofozoítos de E. histolytica (Hidalgo y col, 1990). Encontramos resultados que sugieren una disminución notable de la actividad proteolítica sobre caseína de los quistes en relación a los trofozoítos. Las áreas de hidrólisis sobre el gel de prueba así lo indican. Interpretamos estos resultados como un ajuste estadio específico de la síntesis de proteinasas. El quiste pudiera disminuir la producción de proteinasas probablemente debido a que no se alimenta en este período de latencia. Las proteinasas sirven al trofozoíto para obtener proteínas y aminoácidos que emplea para la construcción de sus enzimas, toxinas y proteínas estructurales. La disminución de su síntesis pudiera reflejar la disminución del metabolismo del quiste. Previamente se ha asociado la actividad proteolítica con la virulencia de los trofozoítos de Entamoeba. (Gadashi y col., 1983a, 1983b, Muñoz y col, 1984, Hidalgo y col., 1990). Sugerimos que la actividad proteolítica puede ser también un marcador estadio específico.

En nuestro estudio comparativo de las esterasas de los trofozoítos y quistes de E. invadens se encontraron resultados que indican que las esterasas principales, a juzgar por el grado de actividad que presentaron, fueron similares en patrón de migración y número en trofozoítos y quistes. Dos esterasas principalmente, las cuales estuvieron presentes tanto en trofozoítos como en quistes. Detectamos únicamente variaciones menores debido a esterasas con actividad débil hacia el substrato a-naftil acetato pre-

senten en los trofozoítos pero no en los quistes. Al igual que las amilasas, se ha reportado la exocitosis de esterases de E. invadens y E. histolytica al medio (Muller y col., 1988). Este conjunto de enzimas, esterases, amilasas y proteinasas parecen ser enzimas que comparten la característica común de ser liberadas al medio por los trofozoítos mediante el proceso de exocitosis y cuyos niveles al parecer se deprimen, según los resultados que presentamos en el estadio de quiste donde se presume existe una menor actividad metabólica.

Pudimos detectar Fe-proteínas en trofozoítos y quistes de E. invadens, un resultado que preveíamos puesto que el Fe es un metabolito importante para los trofozoítos de Entamoeba. No pudimos establecer diferencias estadio específicas en este tipo de proteínas, algunas de las cuales se han asociado al metabolismo respiratorio de las amibas (McLaughley y Aley, 1985). De las dos Fe-proteínas que detectamos ambas parecen estar presentes en quistes y trofozoítos. Es posible que al menos alguna de las dos bandas de Fe-proteína pudiera ser ferredoxina debido a su abundancia en los trofozoítos (Reeves y col., 1980).

## VI. CONCLUSIONES.

Se encontraron diferencias estadio específicas en isoenzimas de la amilasa, quitinasa, proteinasa y esterasa pero no en las enzimas hexokinasa, glucosa fosfato isomerasa, malato deshidrogenasa, fosfoglucomutasa, alcohol deshidrogenasa NADP, alcohol deshidrogenasa NAD dependiente y Fe-proteínas de trofozoítos y de quistes de E. invadens IP-1. Este reporte es la primera descripción de un estudio comparativo de isoenzimas de trofozoítos y de quistes en Entamoeba, así como también es la primera descripción de tinción en geles de poliacrilamida de las isoenzimas de esterasa, amilasa, alcohol deshidrogenasa NAD y NADP dependientes, quitinasa y proteinasa bajo condiciones no desnaturalizantes y Fe-proteínas en Entamoeba. Pensamos que esta metodología que empleamos es muy conveniente y pudiera usarse para establecer que partes del metabolismo se modifican durante el proceso de enquistamiento en Entamoeba.

Estudios cuantitativos de la actividad enzimática específica en trofozoítos y quistes en el tubo de ensayo pudieran ser útiles para mostrar un panorama más exacto de lo que ocurre con las actividades enzimáticas que hemos analizado.

## VII. BIBLIOGRAFIA.

- Acosta Valle H., Muñoz M.L., Calderón J. (1978). Caracterización de las moléculas superficiales de E. invadens. Arch. Invest. Med. Mex. 9(supl 1):175.
- Aley S.B., Scott W.A., Cohn Z.A. (1980). The plasma membrane of E. histolytica. J. Exp. Med. 152:391.
- Arroyo Begovich A., Martínez Palomo A., Sánchez Parés M.E. (1978). Formación de la pared celular durante el enquistamiento de E. invadens. Arch. Invest. Med. Mex. 9(supl 1):17.
- Arroyo Begovich A., Carabez Trejo A., Ruiz Herrera J. (1980). Identification of the structural component of the cyst wall of E. invadens. J. Parasitol. 66:735.
- Arroyo Begovich A., Almanza S. (1982). Alteración del enquistamiento de E. invadens por Calcofluor M2r. Arch. Invest. Med. Mex. 13(supl 1):13.
- Arroyo Begovich A., Carabez Trejo A. (1982). Localization of chitin in the cyst wall of E. invadens with colloidal gold tracers. J. Parasitol. 68:253.
- Avila E.E., Sánchez Garza M., Calderón J., (1985). E. histolytica and E. invadens sulfhidril dependent proteolytic activity. J. Protozool. 32:163.
- Avron B., Deutch R.M., Mirelman D. (1982). Chitin synthesis inhibitors prevent cyst formation by Entamoeba trophozoites. Biochem. Biophys. Res. Comm. 108:815.
- Avron B., Bracha R., Deutch M.R., Mirelman D. (1983). E. invadens and E. histolytica separation and purification of cysts, precysts and trophozoites by centrifugation on discontinuous gradients of Percoll. Exp. Parasitol. 55:265.
- Avron B., Chayen A., Stolarsky T., Schauer R., Mirelman D. (1986). Novel sialic acid containing glucoproteins are produced during the encystation of E. histolytica cultures. Arch. Invest. Med. Mex. 17(supl 1):195.

- Avron B., Stolarsky T., Chayen A., Mirelman D. (1986). Encystation of E. invadens IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. *J. Protozool.* 33:522.
- Bailey B.G., Rengpien S., (1980). Osmotic stress as a factor controlling encystation of E. invadens. *Arch. Invest. Med. Mex.* 11(supl 1):11.
- Balamuth W. (1962). Effects of some environmental factors upon the growth and encystation of E. invadens. *J. Parasitol.* 48:101.
- Barker D.C., Deutch K. (1958). The chromatoid body of E. invadens. *Exp. Cell. Res.* 15:604.
- Barker D.C., Svila G.T. (1964). Localization of cytoplasmic nucleic acid during the growth and encystment of E. invadens. *J. Cell. Biol.* 20:389.
- Barker D.C., Swales L.S., (1972). Comparison of trophozoites helical polysomes with cyst ribosomogen microcrystals in axenic Entamoeba sp. *Cell. Diff.* 1:307.
- Barrow J.H., Stockton J.J. (1960). The influence of temperature in host parasite relationships. *J. Protozool.* 17:377.
- Beaver P.C., Deschamps G. (1949). The viability of E. histolytica cysts in soil. *Am. J. Trop. Med.* 29:189.
- Bird R.G., McCaul T.F. (1976). The rhabdovirus of E. histolytica and E. invadens. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 70:81.
- Bhualtacharya S., Bhattacharya A., Diamond L.S. (1988). Comparison of repeated DNA from strains of E. histolytica and other Entamoeba. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27:257.
- Calderón J., Muñoz M.L. (1980). Surface redistribution and release of antibody induced caps in Entamoeba. *J. Exp. Med.* 151:184.
- Cerbón J., Flores J. (1981). Phospholipid composition and turnover of pathogenic amebas. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 69B:487.

- Chang S.L., Fair G.M. (1941). Viability and destruction of the cysts of E. histolytica. J. Amer. Water. Works. Assoc. 33:1075.
- Chang S.L. (1942). Studies on E. histolytica I. Effect of hydrogen ion concentration on the encystation of E. histolytica in culture. Am. J. Trop. Med. 22:471.
- Chang S.L. (1943). Studies on E. histolytica II. Observations concerning to encystation, maturation and excystation of E. histolytica and on longevity of culture induced cysts in various fluids and at different temperatures. J. Infect. Dis. 72:232.
- Chang S.L. (1945). Studies on E. histolytica V. On the decrease in infectivity and pathogenicity for kitten of E. histolytica during prolonged in vitro cultivation and restoration of these characters following encystment and direct animal passage. J. Infect. Dis. 76:126.
- Chang S.L. (1945). Survival of cysts of E. histolytica in human faeces under low temperature conditions. Am. J. Hyg. 61:103.
- Chang S.L. (1946). Studies on E. histolytica IV. The relationship of redox potential to growth and encystation and excystation of E. histolytica in culture. Parasitol. 37:101.
- Chang S.L. (1950). Kinetics of thermodestruction of cysts of E. histolytica in water. Am. J. Hyg. 52:82.
- Chavez B., Martínez Palomo A., De la Torre M. (1978). Estructura ultramicroscópica de la pared de los quistes de E. invadens, E. histolytica & E. coli. Arch. Invest. Med. Mex. 9(supl 1):13.
- Chayen A., Avron B., Nuchamowitz Y., Mirelman D. (1988). Appearance of sialoglycoproteins in encysting cells of E. histolytica. Infect. Immun. 56:673.

- Cervantes Mamoa A.,Martínez Palomo A.(1980).Estudio del ciclo vital de E.invadens mediante cinematografía espaciada.Arch.Invest.Med.Mex.11(supl 1):31.
- Cheng T.C.(1973).General parasitology.Academic Press.N.York.p.205.
- Chinn B.D.,Jacobs L.,Reardon L.V.,Rees C.W.(1942).The influence of the bacterial flora on the cultivation of E.histolytica.Am.J.Trop.Med.22:137.
- Czeto A.R.,Morgan R.S.,Strother G.K.(1973).The ultraviolet spectra of crhoma-  
toid bodies of E.invadens in situ.Exp.Cell.Res.78:345.
- Davis B.J.(1964).Disc electrophoresis II.Method and applications to human serum proteins.Ann.N.Y.Acad.Sci.121:404.
- Deschiennes R.(1939).Le pouvoir pathogenes des amibes dysenteriques en culture,ses relations avec l'enkystement.Bull.Soc.Pathol.Exot.32:923.
- Deutch K.,Zaman V.(1959).An electron microscopic study of E.invadens Rodhain 1934.Exp.Cell.Res.17:310.
- Diamond L.S.(1968).Techniques of axenic cultivation of E.histolytica Schaudin 1903 and E.histolytica-like ameba.J.Parasitol.54:1047.
- Diamond L.S.,Harlow D.R.,Cunnick C.C.(1978).A new medium for the axenic cultivation of E.histolytica and other Entamoeba.Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.72:431.
- Dobell C.,Laidlaw P.P.(1926).On the cultivation of E.invadens and other entozoic amoeba.Parasitol.18:283.
- Dobell C.(1927).Further observations and experiments on the cultivation of E.histolytica from cysts.Parasitol.19:288.
- Dobell C.(1928).Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I.General introduction.II.Description of the whole life history of E.histolytica in cultures.Parasitol.20:357.

- Dobell C. (1951). Bacterial factors influencing the life history of E. histolytica in cultures. *Parasitol.* 42:18.
- Everitt M.G. (1950). The relationship of population growth to in vitro encystation of E. histolytica. *J. Parasitol.* 36:586.
- Fair G., Chang S.L., Taylor M.P., Wineman M.A. (1945). Destruction of water borne cysts by synthetic detergents. *Am. J. Publ. Health.* 35:228.
- Gadashi H., Kessler E. (1983). Correlation of virulence and collagenolytic activity in E. histolytica. *Infect. Immun.* 39:528.
- Gadashi H., Kobliler D. (1983). E. histolytica: correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Exp. Parasitol.* 71:199.
- Geiman Q.M., Rattcliffe H.L. (1936). Morphology and life cycle of an amoeba producing amoebiasis in reptils. *Parasitol.* 36:208.
- Gelderman A.H., Bartgis I.L., Keister D.B., Diamond L.S. (1971). Characterization of DNA of representative strains of E. histolytica, E. histolytica-like ameba and E. moshkovskii. *J. Parasitol.* 157:912.
- Gelderman A.H., Bartgis I.L., Keister D.B., Diamond L.S. (1971) a. A comparison of genome size and thermal denaturation-derived base composition of DNA of several members of Entamoeba (histolytica group). *J. Parasitol.* 157:918. b.
- Gillin F.D., Diamond L.S. (1980). E. histolytica and E. invadens, effects of temperatures and oxygen tension on the growth and survival. *Exp. Parasitol.* 49:328.
- Gosh T.N. (1969). Quantitative study of DNA (Feulgen) in E. invadens. *Exp. Cell. Res.* 56:97.
- Goordeva L.M. (1966). On the cultivation of E. invadens Rodhain at 37°C. *Acta Protozool.* 4:161.
- Grassé P.P. (1952). *Traité de zoologie, anatomie, systematique biologique.* t. I. Fasc. I., p. 98-100., t. I., Fasc. II. p. 5-91.

- Greiff R.L. (1947). Agglutination of E.histolytica cysts. Am.J.Trop.Med.27:131.
- Halpern B., Dolkhart R.E., (1954). The effect of cold temperature on the viability of cysts of E.histolytica. Am.J.Trop.Med.Hyg.3:276.
- Hernández R., Garduño G., Valadéz A., Muñoz O. (1986). Cambios en el lisil-tRNA asociados al enquistamiento de E.invadens. Arch.Invest.Med.(Mex). 17(supl 1):61.
- Hidalgo M.E. (1990). Cytopathic effect of virulent E.histolytica trophozoites. Correlation with the secretion of cysteine proteinase. Exp. Parasitol.71:199.
- Hill W.C.O., Neal R.A. (1954). A epizootic due to E.invadens at the gardens of the zoological society of London. Proc.Zool.Soc.London.123:731.
- Ishii H., Owashi M., Kawagushi E., Hayashi H., Nakai H. (1981). Experimental transmission of E.invadens from tortoise to the venomous snake Trimeresurus flavoviridis. Snake.13:1.
- Jones M.F., Newton W.L. (1950). The survival of cysts of E.histolytica at temperatures between 45-55°C. Am.J.Trop.Med.30:53.
- Jones M.F. (1952). Studies on treatment of fresh vegetables contaminated with cysts of E.histolytica. I. Acetic acid. Am.J.Trop.Med.Hyg.11:576.
- Keller F., Walter C., Lohden U., Hanke W., Bakker-Grunwald T., Trissl D. (1988). Pathogenic and non pathogenic Entamoeba, pore forming and hemolytic activity. J.Protozool.35:359.
- Kessel J.F., Moore F.J. (1946). Emergency sterilization of drinking water with heteropolar cations. Am.J.Trop.Med.26:345.
- Kofoid C.A., McNeil E., Kopac M.J. (1931). Chemical nature of the cyst wall in human intestinal protozoa. Proc.Soc.Exp.Med.Biol.29:100.

- Kress Y., Wittner M., Rosenbaum R.M. (1971). Sites of cytoplasmic ribonucleo-protein-filament assembly in relation to helical body formation in axenic trophozoites of E.histolytica. J.Cell.Biol.49:773.
- Krupp I.M. (1965). Immunoelectrophoretic analysis of several strains of E.histolytica. Am.J.Trop.Med.Hyg.15:849.
- Kudo R.R. (1960). Protozoologia. Ed.CECSA.Mexico.p.413,
- Kuo C.F., Fridovich I. (1988). A stain for iron containing proteins sensitive to ng level of iron. Anal Biochem.170:183.
- Kusamrarn T., Sobhon P., Bailey G.B. (1975). The mechanism of formation of inhibitor induced ribosome helices in E.invadens. a, J.Cell.Biol.65:529.
- Kusamrarn T., Vinijchaikul K., Bailey G.B. (1975). Comparison of structure and function of polysomal and helical ribosomes from E.invadens. J.Cell. Biol.65:540.b.
- Lake J.A., Slater H.S. (1972). Three dimensional structure of the chromatoid body helix of E.invadens J.Mol.Biol.66:271.
- Lamy L., Molinari V. (1957). Spontaneous and induced encystement of E.histolytica in culture. Bull.Soc.Pathol.Exot.50:31.
- Lamy L., Molinari V. (1958). Diversity and interpretation of different ameba-bacterial flora complex to the action of antibiotics. Bull.Soc. Pathol Exot.51:652.
- Lamy L., Piechaud D. (1963). Utilization of bacterial sensitivity to antibiotics to study the role of bacteria in the determination of the spontaneous encystement of E.histolytica in cultures. Presse Medical.71:142.
- Lesser E. (1953). The effects of some hormones and related compounds on the bacteria free cultures of E.invadens and free living ameba. Can.J. Zool.31:511.

- Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E.G., Deroux G., Grain J., Honingberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R.III., Loom J., Lynn D., Merrinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., Wallace F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27:37.
- Lindmark D.J. (1976). Certain enzymes of energy metabolism of E. invadens Proc. Int. Conf. Amebiasis. Mexico. D.F., Sepulveda B. Diamond L.S. editores. IMSS. p.185.
- Lowry D.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- Market C.L., Hunter R.L. (1959). Histochemical detection of enzymes. *J. Histochem. Cytochem.* 7;42.
- Martínez Palomo A., Gonzalez Robles A., Chavez B. (1976). Ultrastructural study of various Entamoeba strains. Proc. Int. Conf. Amebiasis. Mexico.
- Sepulveda B., Diamond L.S., Eds. IMSS. p.214.  
Mata Cardenas B., Said Fernandez S. (1986). Wall synthesis in axenic medium cultures of E. histolytica grown in PEPHS medium. *Arch. Invest. Med. Mex.* 17(supl 1):25.
- Mathews H.M., Moss D.M., Healy G.R., Visvesvara G.S. (1983). polyacrylamide gel electrophoresis of isozymes from Entamoeba species. *J. Clin. Microbiol* 17:1009.
- McCaul T.F., Poston R.N., Bird R.G. (1978). E. histolytica and E. invadens Chromium release from labeled liver cells in culture. *Exp. Parasitol.* 43:342.
- McConnachie E. (1955). Studies of E. invadens Rodhain, 1934 in vitro and its relationship to some other species of Entamoeba. *Parasitol.* 45:452.
- McConnachie E. (1968). The growth of an axenic strain of E. invadens in different media. *Parasitol.* 58:733.

- McConnachie E. (1969). The morphology, formation and development of cysts of Entamoeba. *Parasitol.* 59:41.
- McConnachie E. (1970). Encystation in axenic cultures of E. invadens. *J. Protozool.* 17(suplement):25.
- McLaughlin J., Meerovitch E. (1975). The surface membranes and cytoplasmic membranes of E. invadens. I. Gross chemical and enzymatic properties. *Comp. Biochem. Physiol B.* 52:477.
- McLaughlin J., Meerovitch E. (1975). The surface and cytoplasmic membranes of E. histolytica and E. invadens Rodhain 1934. II. Polypeptide and phospholipid composition. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 52:487.
- McLaughlin J., Meerovitch E. (1975). Immunochemical studies on the surface and cytoplasmic membranes of E. invadens Rodhain ,1934. *Can. J. Microbiol.* 21:1635.
- McLaughlin J., Aley S. (1985). The biochemistry and functional morphology of Entamoeba. *J. Protozool.* 32:221.
- Meerovitch E. (1958). A new host of E. invadens Rodhain 1934. *Can. J. Zool.* 36:423.
- Meerovitch E. (1958). Some biological requirements and host parasite relations in E. invadens. *Can. J. Zool.* 36:513.
- Meerovitch E. (1960). Thermal barrier to infectivity of E. invadens in snakes. *Nature.* 185.:631.
- Meerovitch E. (1961). Infectivity and pathogenicity of polixenic and monoxenic E. invadens kept at normal and high temperatures and the natural story of reptil amebiasis. *J. Parasitol.* 47;751.
- Meraz Ríos M.A. (1986). Desarrollo de un sistema de electroforesis en poliacrilamida para el análisis de zimodemos de Entamoeba. Tesis de licenciatura. FES Cuautitlan. C. Izcalli Edo. Mex. 131.pp.

- Montalvo F.E., Reeves R.E., Warren L.G. (1971). Aerobic and anaerobic metabolism in E. histolytica. *Exp. Parasitol.* 30:249.
- Mora Galindo J., González F., Feria A. (1986). Ultraestructura de los quistes de E. invadens obtenidos bajo el efecto de emetina, tinidazol, y rifampicina. *Arch. Invest. Med. Mex.* 17:113.
- Morales Vallarta M., Carranza M.P., Ruiz J., Verdugo J. (1989). Cell wall morphogenesis during differentiation of E. invadens Protozoa. *Sarcodina*. in press.
- Morales Vallarta M., Mata D.B., Ramirez E., Segura J.J. (1982). División nuclear y presencia de microtúbulos en la diferenciación de E. invadens *Arch. Invest. Med. Mex.* 13(supl 3):211.
- Morgan R.S., Uzman B.G. (1965). Nature of the packing of ribosomes within chromatoid bodies. *Science.* 152:214.
- Morgan R.S., Kellog F.D. (1967). Bonding radii of 80 S ribosomes. *Nature* 216:1302.
- Morgan R.S. (1968). Structure of ribosomes of chromatoid bodies. Tridimensional Fourier synthesis. *Science.* 162:670.
- Morgan R.S., Slayter H.S., Weller D.L. (1968). Isolation of ribosomes of cysts of E. invadens *J. Cell, Biol.* 36:45.
- Morgan R.S., Satillaro R.F. (1972). Zinc in E. invadens. *Science.* 176:929.
- Morgan R.S., Ward W.T., Morgan N.H. (1974). Tryptophan content and fluorescence of cysts of E. invadens. *Biochem. Biophys. Acta.* 371:238.
- Müller F.W., Franz A., Werries E. (1988). Secretory hidrolases of E. histolytica. *J. Protozool.* 35:291.
- Müller M., Nseka V., Mack R.S., Lindmark S.G. (1979). Effects of 2-4 DNP on trichomonas and E. invadens. *Comp. Biochem Physiol. B.* 64:97.

- Muñoz M.L., Acosta Valle H., Calderón J. (1978). Redistribución de anticuerpos superficiales y su caracterización inmunoquímica. Arch. Invest. Med. Mex. 9(supl 1):183.
- Muñoz M.L., Rojkind M., Calderón J., Tanimoto M., Arias Negrete S., Martínez Palomo A., (1984). E. histolytica. Collagenolytic activity and virulence. J. Protozool. 31:468.
- Myer D.F., Morgan R.S. (1971). Evidence for a link between division and differentiation in E. invadens J. Protozool. 18:282.
- Neal R.A. (1965). The influence of encystation upon the virulence of E. histolytica to rats. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 48:533.
- Neal R.A. (1966). Experimental studies in amebiasis with special reference to speciation. Adv. Parasitol. 4:1.
- Neal R.A., (1974). Survival of Entamoeba and related ameba at low temperatures. I. viability of Entamoeba cysts at 4°C, Int. J. Parasitol. 4:227.
- Neal R.A. (1974)a. Survival of Entamoeba and related ameba at low temperature. II. Viability of ameba and cysts stored under liquid nitrogen. Int. J. Parasitol. 4:353.
- Offutt A.C., Poole D.A., Fassnacht G.G. (1955). A water borne outbreak of amoebiasis. Am. J. Publ. Health. 45:486.
- Ostoa Saloma P., Cabrera N., Becker I., Pérez Montfort R (1989). Proteinases of E. histolytica associated with different subcellular fractions. Mol. Biochem. Parasitol. 32:133.
- Pan C.T., Geiman Q.M. (1955). Comparative studies of intestinal amebae. I. Distribution and cyclic changes in nucleic acids in E. histolytica and E. coli. Am. J. Hyg. 62:66.

- Phillips B.P.,Bartgis I.L.(1954).Effects of growth in vitro with selected microbial associate and of encystation on the virulence of E.histolytica to guinea pigs.Am.J.Trop.Med.Hyg.3:621.
- Phillips B.P.(1973).E.histolytica:Concurrent irreversible loss of infectivity,pathogenicity and encystment potential after prolonged maintenance in axenic culture in vitro.Exp.Parasitol.34:163.
- Price M.,Spetch C.,Bodreau R.E.,Shaw D.E.Weller D.L.(1983).Preliminary characterization of ribosomes of E.invadens.Mol.Biochem.Parasitol.8:137.
- Proctor E.M.,Gregory M.A.(1973).Ultrastructure of cysts of E. histolytica. J.Parasitol.3;455.
- Ramírez Rojas O.,Arroyo Begovich A.(1980).Orígen de las paredes en forma de saco observadas en cultivos de E.invadens en proceso de enquistamiento. Arch.Invest.Med.Mex.9(supl 1):17.
- Ramírez Rojas O.,Arroyo Begovich A.(1982).Actividad quitinolítica en E. invadens Arch.Invest.Med.Mex.13(supl 3):17.
- Reardon L.V.,Verder E.,Rees C.M.,(1942).The cultural requirements of E. coli and the comparative effect of drying on the cysts of E.coli and E.histolytica. Am.J.Trop.Med.Hyg.1:155.
- Ravdin J.I.(1982).A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis.Rev.Infect.Dis.4:1185.
- Ravdin J.I.,Murphy C.F.,Salata R.A.,Guerrant R.L.,Hewlett E.L.(1985). Nac-Gal-inhibitable adherence lectin of E.histolytica.I.Partial characterization and relation to amebic virulence in vitro.J.Infect.Dis.151:804.
- Reeves R.E.,Montalvo G.,Sillero A.(1967).Glucokinase of E.invadens and related organisms.Biochem 6:1752.
- Reeves R.E.,Bishop J.M.(1968).Classification of Entamoeba species by means of electrophoretic properties of amebal enzymes.J.Parasitol.54:594.
- Reeves R.E.(1974).Glycolytic enzymes of E.histolytica.Arch.Invest.Med.5(sup 2):411.

- Reeves R.E.,Guthrie J.D.,Lobelle Rich P.(1980).E.histolytica.Isolation of Ferredoxin.Exp.Parasitol.49:83.
- Rengpien S.,Bailey G.(1975).Differentiation of Entamoeba.A new medium and optimal conditions for axenic encystation of E.invadens J.Parasitol. 61:24.
- Richards C.S.,Goldman M.,Cannon L.T.(1966).Cultivation of E.histolytica and E.histolytica-like ameba at reduced temperature and behavior of the ameba in diluted media.Am.J.Trop.Med.Hyg.15:648.
- Rondanelli E.G.,Osculatti F.,Gerna G.,Fiori G.P.(1966).Ricerca microelettroniche su E.invadens.Bull.Inst.Sieroterap.Milan 44:215.
- Rondanelli E.G.,Osculatti F.,Gerna G.,Carosi G.(1968).Comparazioni ultrastrutturali fra diverse specie di Entamoeba a cisti tetranucleate. E.moshkovskii,E.histolytica-Laredo,E.histolytica,E.invadens.Boll.Ist. Sieroterap.Milan.46:583.
- Rosenbaum R.M.,Wittner M.(1970).Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of E.histolytica with particular reference to helical bodies.J.Cell.Biol.49:773.
- Sapero J.J.,Hakansson E.G.,Louttit C.M.(1942).The occurrence of two significantly distinct races of E.histolytica.Am.J.Trop.Med.22:191.
- Sargeant P.G.,Williams J.E.,Greene J.D.(1978).The differentiation of invasive and non invasive amebiasis by isozyme electrophoresis. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.72:519.
- Sargeant P.G.,Williams J.E.(1980).A comparative study of E.histolytica (NIH 200,HK9,etc.,)E.histolytica-like and other morphologically identical ameba using isoenzyme electrophoresis.Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 74:469.

- Siddiqui W.A., Rudzinska M.A. (1965). The fine structure of axenically grown trophozoites of E. invadens with special reference to nucleus and helical ribonucleoprotein bodies. *J. Protozool.* 12:44.
- Simitch T. Petrovich Z., Chibalitch D. (1954). The viability of the cysts of E. histolytica outside the body. *Arch. Inst. Pasteur. Algerie.* 32:223.
- Sirijintakarn P., Bailey G., (1980). The relationship of DNA synthesis and the cell cycle events to encystation by E. invadens. *Arch. Invest. Med. Mex.* 11(supl 1):3.
- Snyder T.L., Meleney H.E., (1941). The excystation of E. histolytica in bacteriologically steril media. *Am. J. Trop. Med.* 21:63.
- Stringer R. (1972). New bioassay system for evaluating percent survival of E. histolytica cysts. *J. Parasitol.* 58:306.
- Svensson R. (1971). E. histolytica. Encystation and cultivation of several isolates. *Exp. Parasitol.* 30:270.
- Thepsuparungsikul V., Seng L. Bailey G. (1971). Differentiation of Entamoeba invadens in monoxenic and axenic cultures. *J. Parasitol.* 57:1288.
- Thorig G.E.W. (1975). Variation between electrophoretically identical alleles at ADH locus of D. Melanogaster. *Biochem. Genet.* 13:721.
- Trissl D., Martínez Palomo A., De la Torre M., Chávez B. (1976). Estudio cuantitativo de la aglutinación de cepas patógenas de E. histolytica inducidas por Concanavalina A. *Proc. Int. Conf. Amebiasis. México. Sepúlveda B, Diamond L.S. editors. IMSS.* p.261.
- Trudell J. Asselin A. (1989). Detection of chitinase activity after polyacrylamide electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178:363.
- Van Vlieth H.H.D.M., Op Dem Kamp J.A.F., Van Deenen L.L.M. (1975). Phospholipids of E. invadens. *Arch. Biochem. Biophys.* 171:55.

- Van Vlieth H.H.D.M., Spies F., Linnemans A.M., Klepke A., Op Dem Kamp J.A.F., Van Deenen L.L.M. (1976). Isolation and characterization of the subcellular membranes of E. invadens J. Cell Biol. 71:357.
- Vargas M.A., Zinker S., Orozco E. (1986). Caracterización de las proteínas ribosomales de E. histolytica. Arch. Invest. Med. Mex. 17(supl 1):81.
- Vázquez de Lara L.G., Arroyo Begovich A. (1984) Induction of encystation of E. invadens by removal of glucose of the culture medium. J. Parasitol. 70:629.
- Ward T. (1971). Human salivary amilase. Genetic and electrophoretic variants. Am. J. Hum. Genet. 23:403.
- Weinbach E.C., Diamond L.S., (1974). Entamoeba histolytica I. Aerobic metabolism. Exp. Parasitol. 35:232.
- Werner F., Bachman U., Braun R (1976). Extraordinary mortality by amebiasis in a lizard (Sphenodon punctatus), in young soup turtle (Chelonya midas) and in false Caretta turtle (Caretta caretta) I. Amebiasis in Sphenodon punctatus. Salamandra 12:94.
- Werner F., Sachsse W., Winkelstraetter K.H. (1976). Extrordinary cases of death by amebiasis in a lizard (S. punctatus) in young Chelonya midas and in Caretta caretta II. Amebiasis in Chelonya midas and Caretta caretta. Salamandra 12:120.
- Werries E., Nebinger P. (1984). Ocurrence of b-amilase in E. histolytica Mol. Biochem. Parasitol. 18:211.
- Werries E., Müller F. (1986). Studies on the substrate specificity of a and b amilase of E. histolytica. Mol. Biochem. Parasitol. 18;211.
- Yap E.H., Zaman V., Aw S.E. (1970). The use of cyst antigen in serodiagnosis of amebiasis. Bull WHO. 42:553.
- Yoshikawa H., Yamada M., Yoshida Y. (1988). Freeze fracture study of the trophozoite and the cyst of E. histolytica. J. Protozool. 35:268.

- Young J.D.E., Lu L.P., Unkeless J.C., Cohn Z.A. (1982). Characterization of a membrane pore forming protein from E.histolytica. J.Exp.Med.156:342.
- Zaman V, (1962). An electronic microscopic observation of starch ingestion by E.invadens. Rodhain, 1934. Trans, Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 57:535.
- Zaman V. (1966). The application of fluorescent antibody test to cysts of E.invadens. Experientia. 21:357.
- Zaman V. (1967). Antigenic relationships between the cysts and the trophozoites of E.invadens. Experientia 23:1072.
- Zarain A., Arroyo Begovich A. (1985). Characterization of a calcium dependent ATP-ase in E.invadens. Biochem. Biophys. Acta. 816:258.