

24/10/89



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**DESARROLLO DE MICROCULTIVOS DE ALGUNAS  
ESPECIES DE Entamoeba**

**FALLA DE ORIGEN**

**T E S I S**

**QUE PRESENTA :**

**PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE**

**LICENCIATURA EN BIOLOGIA**

**LORENA LOPEZ GRIEGO**



1989



## **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 está 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.

CONTENIDO	PAGINA
Agradecimientos -----	vi
Lista de Figuras -----	viii
Lista de Tablas -----	x
Resumen -----	xi
I. INTRODUCCION-----	1
A. Generalidades: El género <u>Entamoeba</u> , su clasificación y la amibiasis. -----	1
B. Descripción de <u>Entamoeba invadens</u> y de <u>Entamoeba histolytica</u> .-----	5
C. Ciclo de vida de <u>Entamoeba</u> -----	8
D. Enquistamiento -----	9
E. Bioquímica de <u>Entamoeba</u> .-----	15
F. Historia de los cultivos de <u>Entamoeba</u>	16
G. Objetivos. -----	17
II MATERIAL Y METODOS-----	18
A. Microorganismos -----	18
B.1) Medios de cultivo -----	18
2) Medios de enquistamiento para <u>Entamoeba invadens</u> -----	20

## CONTINUACION CONTENIDO

C.	Mantenimiento de los cultivos -----	20
D.	Construcción del dispositivo para microcultivos de <u>Entamoeba</u> .-----	22
	1.- Construcción de las cámaras ultradalgadas para microcultivos de <u>Entamoeba</u> .-----	22
	2.- Material utilizado para montar y conectar el sistema.-----	23
	3.- Construcción de varios tipos de cámaras de crecimiento.-----	24
	4.- Armado y funcionamiento del sistema de microcultivo.-----	29
E.	Estimación del crecimiento de la población amibiana -----	34
F.	Procedimiento para los experimentos de enquistamiento -----	35
G.	Estimación del enquistamiento de <u>Entamoeba invadens</u> -----	36
H.	Limpieza del sistema-----	37
<b>III RESULTADOS -----</b>		<b>38</b>
A.	Dispositivo para el microcultivo de <u>Entamoeba</u> .-----	38
	1. Construcción:	
	a) Acrílico -----	38
	b) Resina epóxica -----	41
	c) Vidrio -----	42

## CONTINUACION CONTENIDO

2. Determinación de las condiciones óptimas para el funcionamiento de la cámara. -----	44
B. Desarrollo de microcultivos de <u>Entamoeba</u>	48
1. Determinación de variables importantes para el crecimiento de <u>Entamoeba</u> en la cámara. -----	48
C. Inducción del enquistamiento de <u>Entamoeba invadens</u> en microcultivos.-----	65
IV. DISCUSION -----	70
V. CONCLUSIONES -----	77
VI. BIBLIOGRAFIA -----	78

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Ciclo de vida de <u>Entamoeba histolytica</u>	10
2	Cámara para microcultivo de <u>Entamoeba</u> tipo A.	25
3	Cámara para microcultivo de <u>Entamoeba</u> tipo B.	27
4	Cámara para microcultivo de <u>Entamoeba</u> tipo C.	30
5	Sistema para microcultivo de <u>Entamoeba</u>	32
6	Cámara para microcultivo de <u>Entamoeba</u> tipo C; mostrando la retícula que se cons- truyó.	46
7	Aspecto microscópico de un microcultivo de <u>Entamoeba invadens</u> .	50
8	Distribución de <u>Entamoeba invadens</u> en la cámara de microcultivo.	53
9	Curva de crecimiento de <u>Entamoeba invades</u> en función de la temperatura y el flujo del medio de cultivo.	55

## CONTINUACION LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
10	Aspecto microscópico de un microcultivo de <u>Entamoeba histolytica</u> .	58
11	Aspecto microscópico de un microcultivo de <u>Entamoeba histolytica</u> .	60
12	Curva de crecimiento de <u>Entamoeba histolytica</u> en función de la temperatura y el flujo del medio de cultivo.	63

## LISTA DE TABLAS

TABLA		PAGINA
I	Composición del medio de cultivo TYI-S-33	19
II	Composición del medio axénico de enquistamiento (AEM).	21
III	Antibióticos que se añadieron al medio de cultivo.	43

## RESUMEN

Se desarrolló un sistema de microcultivo para Entamoeba mediante el empleo de cámaras ultradelgadas en el cual las características del medio de cultivo se mantienen sin cambio y las amibas en crecimiento pueden observarse constantemente en el microscopio con la ventaja de poder variar rápidamente las propiedades del medio de cultivo para determinar las condiciones óptimas para el crecimiento y enquistamiento de la amiba.

En este sistema se pueden obtener cultivos a partir de un inóculo pequeño de amibas (4-10). Se desarrollaron microcultivos de Entamoeba invadens y de Entamoeba histolytica observándose en algunos casos en ambas especies una fase lag de crecimiento con duración de 24-36hrs después de la cual el número de amibas aumentó siguiendo una cinética exponencial. El tiempo aparente de generación medio que se observó para E. invadens fue de 26-28hrs, en cambio para E. histolytica fue de 23-24hrs. Cuando el inóculo inicial de E. invadens fue de 1119 amibas, 4 días de crecimiento activo fue tiempo suficiente para que su distribución en la cámara se extendiera hasta alcanzar el total de su superficie (444mm<sup>2</sup>). En general E. invadens mostró tendencia a no formar agregados y a crecer hasta dar lugar a una monocapa confluyente. En cambio E. histolytica creció más rápido cubriendo la superficie

Interna de la cámara en 5 días de crecimiento activo cuando el inóculo inicial fue de 485 amibas, su crecimiento no sólo fue en monocapa en la cara inferior de la cámara sino que cubrió todas las caras de la cámara formando agregados múltiples. Se realizaron varios experimentos en los que la duración del cultivo en forma continua a 26 ó 37°C fue mayor de 30 días sin que se presentara contaminación. Se indujo el enquistamiento de Entamoeba invadens mediante el empleo de diversos medios de enquistamiento observándose dicho fenómeno en porcentajes muy bajos.

## I. INTRODUCCION

### A. Generalidades: el género Entamoeba, su clasificación y la amibiiasis.

El género Entamoeba se caracteriza por tener un núcleo vesicular, con un endosoma relativamente pequeño situado en o cerca del centro con un número variable de gránulos periféricos no cromáticos adheridos a la membrana nuclear; poseen cromatina en el endosoma y en la región peritendosomal. (Kudo, 1985). Los trofozoítos de todas las especies son uninucleados, pero en algunas especies ocurren dos o tres divisiones nucleares así que, el quiste maduro contiene de 4 a 8 núcleos. Los quistes jóvenes presentan cuerpos cromatoides, los cuales son alargados, refringentes; su nombre se debe a la afinidad que tienen estos cuerpos por colorantes bifásicos como el hierro y la hematoxilina que sólo tiñen el material nuclear, por lo que los cromatoides se tiñen de negro intenso. Los cuerpos cromatoides son inclusiones celulares las cuales se ha demostrado que son agregados de ribosomas dispuestos en forma helicoidal, (Barker y Swales, 1972). Estos cuerpos varían en número y forma dependiendo de la especie de Entamoeba que se trate por lo cual se consideran como un carácter taxonómico adecuado para distinguir las entre sí. (Neal, 1966).

De acuerdo a Levine et al., (1980), el género se ubica de la siguiente manera:

Reino Protista Haeckel, 1866

Subreino Protozoa Goldfuss, 1818, emd. Von Siebold, 1846

Phylum Sarcomastigophora Heringberg y Ralamuth, 1963

Subphylum Sarcodina Schmarda, 1871

Superclase Rhizopoda Von Siebold, 1845

Clase Lobosea Carpenter, 1861

Subclase Gymnamoeba Haeckel, 1862

Orden Amoebida Ehrenberg, 1830

Suborden Tubulina Bovee y Jahn, 1966

Familia Entamoebidae Chatton, 1925

Género Entamoeba Casagrandi y Barbagallo, 1895.

El género Entamoeba tiene un gran significado médico por incluir especies parásitas y patógenas para el hombre así como para algunos animales; presenta características biológicas interesantes como su metabolismo único y la carencia de diferenciación morfológica comparada con otras células eucariontes. (McLaughlin y Aley, 1985).

El estudio de la biología del género Entamoeba se ha efectuado principalmente en dos especies: E. invadens y E. histolytica, comparativamente se han realizado pocos trabajos en otras especies, (Neal, 1966 ; McConnachie, 1969).

E. histolytica ha sido estudiada con mayor detalle debido a que ésta parasita al hombre, causando principalmente padecimientos intestinales y el absceso hepático amibiano. El mecanismo de transmisión de E. histolytica se establece por la ingestión de alimentos y agua contaminada o bien por contagio directo: el llamado ciclo ano-mano-boca. La amibiasis afecta a un alto porcentaje de la población en México, su distribución varía entre el 5% y el 75% de la población, dependiendo del área geográfica, predominando en los medios pobres y mal saneados; se ha observado que su incidencia aumenta conforme aumenta la edad del individuo, (Kumate, 1977).

Como se mencionó anteriormente E. invadens ha sido muy estudiada, es un parásito de reptiles. El estudio de esta amiba se inició con su descubrimiento durante una epizootia en el jardín zoológico de Antwerp, Canada, (Rothain y Hoof, 1934), donde un gran número de reptiles en cautiverio fueron afectados por este parásito; desde entonces se han descrito epidemias similares en Estados Unidos, (Ratcliffe y Geiman, 1938); Londres, (Hill y Neal, 1954) y Suiza, (Steck, 1961).

Este organismo ha atraído la atención para su estudio debido a la facilidad con la que se cultiva y a su fácil manipulación experimental en el laboratorio, además de ser actualmente el mejor modelo para la investigación del enquistamiento del género Entamoeba. En él se pueden observar los cambios morfológicos y funcionales durante su diferenciación, gracias a que puede lograrse su enquistamiento in vitro en medio axénico en forma eficiente.

Los cambios estructurales durante el ciclo de vida de ambas especies son muy parecidos, (Geiman y Ractliffe, 1936); se ha observado también que ambas especies utilizan la misma vía metabólica para la producción de energía, (Reeves, 1972), igualmente tienen gran similitud en la mayoría de los aspectos tanto fisiológicos como morfológicos, (Mc Connachie, 1955). Además de sus diferencias morfológicas que se describen más adelante, las diferencias más significativas entre E. invadens y E. histolytica son por un lado la temperatura óptima de crecimiento, ya que E. invadens crece a 25-26 °C mientras que E. histolytica crece a 36-37 °C, y por el otro, el que parasitan a diferentes huéspedes: E. invadens parasita a reptiles y E. histolytica parasita a mamíferos como algunos primates incluyendo el hombre.

## B. Descripción de Entamoeba invadens Y de Entamoeba histolytica

Entamoeba invadens Rodhain ( 1934 ). Este autor describe a E. invadens como parásita de serpientes. E. invadens es la Entamoeba parásita de reptiles mejor conocida . El habitat natural de esta amiba es el intestino de reptiles, las serpientes son más susceptibles a la infección, sin embargo, la observación de que las serpientes mueren después de la infección por estas amibas sugiere que éstos reptiles no son los huéspedes naturales. Debido a que las tortugas son infectadas fácilmente y se observan quistes en las heces, se pensó que estos animales pudieran actuar como portadores (Rodhain y Hoof, 1936), lo que se ha probado mediante la infección de E. invadens en el intestino de una tortuga (Chrysemys picta) en su habitat natural. (Meerovitch, 1958a).

Los trofozoítos de E. invadens miden 15.9 µm de diámetro en promedio, (9.2-38.6 µm); se reproducen por fisión binaria y su movimiento está dado por la emisión de pseudópodos únicos o múltiples, presenta actividad pinocítica y fagocítica, se alimentan de leucocitos, células del hígado, restos de células epiteliales, bacterias, etc.; su núcleo se encuentra situado central o excéntricamente, contiene un endosoma que puede ser grande o pequeño . El citoplasma de los

trofozoítos contiene vacuolas, algunas de éstas son vacuolas alimenticias, carece de aparato de Golgi, mitocondrias y retículo endoplásmico. También en el citoplasma se puede observar la presencia de fagolisosomas y gránulos de glucógeno.

Los quistes de E. invadens miden 13.9  $\mu\text{m}$  en promedio (11-20  $\mu\text{m}$ ), de diámetro; poseen 4 núcleos cuando son maduros, cuerpos cromatoides aciculares y vacuolas con glucógeno. El citoplasma del quiste es divisible en 2 regiones: áreas oscuras distribuidas alrededor de los núcleos y colindando a la pared celular que muestran estratificación y áreas claras que se encuentran entre éstas. Las áreas oscuras tienen numerosas vacuolas; las áreas claras muestran grandes espacios en los que probablemente contiene glucógeno. El núcleo de los quistes es diferente en apariencia a aquellos de los trofozoítos, las características distintivas son las vacuolas y los cuerpos muy densos que se muestran situados alrededor de su periferia. (Deutsch y Zaman, 1959).

La amiba en estado de trofozoíto produce lesiones en el estómago, duodeno, íleon, colon y, en el hígado de los animales huéspedes. (Kudo, 1985).

Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903. El trofozoíto de esta amiba mide 25 $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio, (10-60 $\mu\text{m}$ ); presenta gran movilidad y actividad pinocítica y fagocítica. El citoplasma consiste de un claro ectoplasma y un endoplasma finamente granular, al igual que E.

Invadens no presenta aparato de Golgi, mitocondrias y retículo endoplásmico; gránulos citoplásmicos constituidos de glucógeno y gotitas de lípidos distribuidos sin patrón definido, ribosomas libres y conjuntos de ellos agrupados en disposición helicoidal sobre haces filamentosos paralelos denominados cuerpos ribonucleoproteicos; se observa un citoesqueleto constituido de microtúbulos y microfilamentos cortos. Presenta un núcleo central de 3-5  $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio con un endosoma que ocupa 20% del núcleo en la región central, gránulos de cromatina condensada en la cara interna de la membrana nuclear y vesículas internas, (Miller et al., 1961; Rosenbaum y Wittner, 1970; Chevez et al., 1972; y Proctor and Gregory, 1973).

El trofozoito de E. histolytica se reproduce por fisión binaria, en algunas ocasiones las amibas permanecen pequeñas después de la división; tales amibas son lentas y se conocen como formas prequisticas. La amiba prequistica luego secreta una pared resistente y se enquistas. El quiste, altamente refringente, es esférico y mide de 5-20  $\mu\text{m}$  de diámetro; al principio el quiste contiene glucógeno difuso y cuerpos cromatoides semejantes a un bastón con extremidades redondas. A medida que el quiste madura estas inclusiones son absorbidas y desaparecen, se cree que se dispersan en él; ningún cambio posterior se realiza en el quiste mientras éste permanece fuera del huésped ya que el quiste es el estado mediante el cual el organismo

inicia su ciclo de vida en un huésped nuevo, (Kudo, 1985). La amiba en estado de trofozoíto vive en el lumen y en los tejidos de la pared de éste último y puede producir una ulceración característica del colon, la cual es acompañada típicamente por síntomas de disentería amébrica. A través de la vena porta, la amiba puede invadir el hígado, cerebro, pulmón, testículos, etc., y producir abscesos. (Kradolfer y Gross, 1958; Beheyt et al., 1961).

### C. Ciclo de vida de Entamoeba.

En el ciclo de vida de Entamoeba se presentan 2 estadios, la forma vegetativa que es la célula ameboide o trofozoíto y la forma latente o quiste. El ciclo de vida de este género se tipifica con el ciclo de vida de Entamoeba histolytica. (figura 1). El trofozoíto es la forma de baja resistencia a cambios en el medio ambiente debido a que no presenta ninguna estructura extracelular que le brinde protección, su movimiento está dado por la emisión de pseudópodos, (lobópodos), únicos o múltiples, se alimenta por fagocitosis y pinocitosis, su reproducción es por fisión binaria. Las especies parásitas viven en el lumen intestinal de los huéspedes. Los trofozoítos cuando perciben algún cambio en las condiciones ambientales y, por mecanismos aún desconocidos, dan lugar a la forma quística en la cual la célula está rodeada por una pared protectora de la que se ha reportado contiene microfibrillas de quitina. (Arroyo-

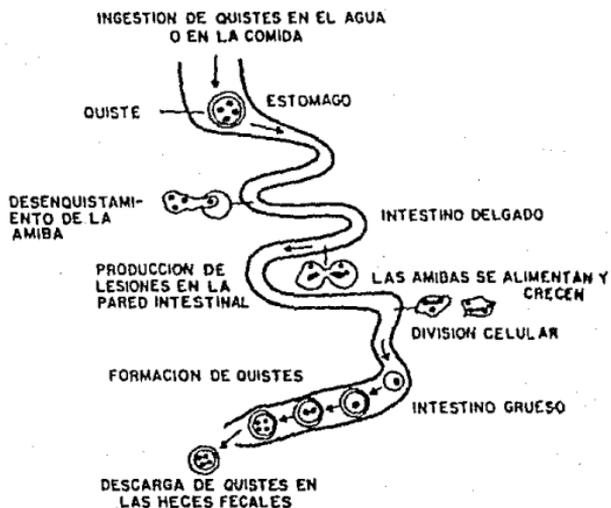
Begovich et al, 1980 a, b), lo que la hace muy resistente. Los trofozoítos en proceso de enquistamiento aparecen redondeados, observándose la desaparición progresiva de vacuolas y la producción de cuerpos cromatoides. El quiste presenta un metabolismo bajo lo que le permite sobrevivir en ambientes desprovistos de las condiciones naturales necesarias para la vida activa del trofozoíto. En vista de la presencia de la pared y su metabolismo disminuido, esta forma puede diseminarse al salir del huésped portador sin que la amiba sufra daño alguno y, así pueda infectar o llegar a otro huésped para continuar su ciclo de vida transformándose en el interior de éste de nuevo en trofozoíto.

#### D. Enquistamiento

Algunos protistas eucariontes son capaces de enquistarse y, en algunos casos el enquistamiento se relaciona con los procesos de reproducción pero generalmente, está considerado como una respuesta a condiciones ambientales desfavorables que son subóptimas para el crecimiento del organismo. El enquistamiento implica una reorganización de las estructuras subcelulares de la célula vegetativa. El quiste es importante en la transmisión de la amiba parásita y puede ser considerado como un ejemplo de diferenciación celular, (Tomlinson y Jones, 1962; Trager, 1963; Neff et al, 1964 b).

**FIGURA No.1.** Ciclo de vida de Entamoeba histolytica.  
El ciclo de vida de E. histolytica consta morfológicamente de 2 estadios: trofozoito y quiste. El huésped natural de este parásito son los primates superiores y el hombre. Los quistes al ser ingeridos en el agua o alimentos contaminados llegan al estómago del huésped, se desenquistan pasando después al intestino grueso en el cual las amibas se alimentan, crecen y se dividen pudiendo provocar lesiones en la pared intestinal. Cuando los trofozoitos perciben algún cambio en las condiciones ambientales y, por mecanismos aún desconocidos comienzan a redondearse y a formar una pared resistente dando origen a los quistes los cuales son descargados hacia el exterior en las heces. Los quistes que son muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables son dispersados por las lluvias contaminando así el agua y los alimentos, comenzando de nuevo el ciclo vital de la amiba.

## CICLO VITAL DE ENTAMOEBIA HISTOLYTICA



Se han desarrollado técnicas para inducir el enquistamiento de las amibas, pero hasta la fecha sólo se ha podido lograr el enquistamiento de E. invadens en medio axénico. Los factores que se han estudiado en el enquistamiento de E. invadens in vitro en cultivos axénicos son: temperatura, densidad de población, tensión de oxígeno y viscosidad sin haberse probado que alguno de estos factores sea el único determinante, (Balamuth, 1962; McCornachie, 1969; Vázquez de Lara-Cisneros y Arroyo-Begovich, 1984).

Estudios en relación con la síntesis de DNA y la división celular durante el enquistamiento, (Myer y Morgan, 1971; Sirijintakarn y Bailey, 1980), sugieren que la división celular es un fenómeno que está ligado al enquistamiento y mediante el análisis cuantitativo del DNA, se ha concluido que E. invadens, en la fase vegetativa podría tener el genoma por cuadruplicado, así como también que el trofozoíto antes de transformarse en quiste se encuentra en la fase G1 del ciclo celular, lo que sería una peculiaridad en estos eucariontes, (Bailey y Rengpien, 1980) En cultivos xénicos Chang, (1946), encontró para E. histolytica cierta relación entre el enquistamiento y un cambio abrupto en el potencial de óxido-reducción, sin embargo, Balamuth (1962), en sus estudios con E. invadens, relaciona más bien la aparición de quistes con el aumento en la densidad de la población de amibas en el cultivo y

sugirió que esto pudiera ser el resultado del agotamiento de la fuente de carbono, lo que ha sido señalado por otros autores, (Mc Connachie, 1955). Un método descrito recientemente para el enquistamiento de *E. invadens* involucra la transferencia de trofozoítos de un medio de crecimiento normal a un medio de enquistamiento, en el que se dejó primero crecer bacterias y después se filtraron éstas de dicho medio para poder utilizarlo. (Thepsarungsikul, et al., 1971).

Ha tenido éxito la estimulación del enquistamiento de *E. invadens* en condiciones axénicas, simplemente por la dilución del medio de crecimiento de los trofozoítos con agua destilada estéril, (Mc Connachie, 1969, 1970), al igual que con otro método en el cual se utiliza un medio de enquistamiento con osmolaridad disminuida, (Richards et al., 1966; Rengpien y Bailey, 1975). Bailey y Rengpien (1980), presentaron evidencia de que bajo las condiciones experimentales utilizadas por ellos, el choque osmótico per se induce el enquistamiento sin que se requiera de la disminución de nutrientes en el medio, sin embargo, Vázquez de Lara-Cisneros y Arroyo-Begovich, (1984), recientemente demostraron que se podía obtener una gran producción de quistes en un medio normal de crecimiento carente de glucosa. Estos autores utilizaron el colorante calcofluor M2-R, que tiñe a la quitina debido a que ésta es un beta-polisacárido de naturaleza cristalina, que da lugar a una fluorescencia

intensa en presencia de beta-polisacáridos cristalinos, lo que les permitió estimar el número de quistes presentes en los cultivos.

El estudio del enquistamiento de E. histolytica ha sido difícil por la imposibilidad que existe para inducir el fenómeno en cultivos axénicos, debido a que sólo se ha podido enquistar a esta amiba in vitro en cultivos bifásicos mixtos, utilizando varias especies bacterianas asociadas, (Balamuth, 1962). Gracias a que ahora se sabe que la quitina es el componente principal de la pared del quiste se han abierto caminos para encontrar las estrategias futuras para el control de la amebiasis humana y poder entender el mecanismo bioquímico de la diferenciación celular en Entamoeba histolytica.

## E. Bioquímica de Entamoeba

La utilización de los medios de cultivo axénicos permitió que el campo de estudio de Entamoeba se ampliara. Desde el punto de vista bioquímico se encontró que Entamoeba degrada glucosa hasta piruvato mediante la vía de Embden Meyer-Hoff, (Reeves, 1972), aunque no se ha encontrado al lactato como producto final, así como tampoco se ha detectado actividad de lactato deshidrogenasa, (Gutteridge y Coombs, 1977). Una adaptación bioquímica poco usual que se ha descrito en E. histolytica es la capacidad que tiene ésta para utilizar al pirofosfato (PPi), en lugar de ATP en algunas reacciones glucolíticas, (Reeves, 1976); por otra parte, se conoce que los principales productos del metabolismo de la glucosa en la ameba son CO<sub>2</sub> y etanol, (Montalvo et al., 1971); y además que E. histolytica no solo es capaz de consumir oxígeno sino que tiene una gran afinidad por ese gas, (Weinbach y Diamond, 1974). Por otro lado se ha demostrado que estos parásitos requieren de riboflavina, (Lo y Reeves, 1979), así como de los precursores de los ácidos nucleicos como adenina, en menor grado guanina, (Reeves y West, 1982; Roonjayaogor et al., 1980), grasos de cadena larga, (Vanvliet et al., 1975) y cisteína, (Guillin y Diamond, 1980 a).

## F. Historia de los cultivos de Entamoeba

En 1875 se descubrió el agente causal de la disentería humana por el investigador Fedor Aleksandrevitch Lösh, y el primero en obtener un cultivo in vitro de E. histolytica fue Cutler, quien en 1918 la cultivó en un medio compuesto de sangre, huevo y flora bacteriana diversa; poco tiempo después, en 1925 Boeck y Drbohlav, la cultivaron en condiciones xénicas utilizando el medio de Lösh a base de clara de huevo, suero y una fase líquida isotónica, (Lösh, 1875). E. histolytica fue cultivada axénicamente por primera vez, por Diamond, (1961), en el medio al que denominó TPS-1, este medio no incluye la presencia de otros microorganismos y está compuesto principalmente por Trypticase (un hidrolizado tróptico de caseína), Panmede (un extracto acuoso del hígado bovino), y suero (bovino).

Más tarde este mismo autor describió otro medio que llamo TYI-S-33, (Trypticase, extracto de levadura, hierro, suero), (Diamond et al., 1978), gracias al cual en la actualidad se ha mejorado el cultivo axénico tanto de E. invadens como de E. histolytica. Otro medio que ha sido reportado, permite a las amibas mantenerse viables y adheridas a las paredes del matraz por tiempos cortos, (Gillin y Diamond, 1980), el cual no es muy eficaz ni recomendable para mantener a los cultivos por más de 24 hrs, pero ha ayudado a conocer parte de la biología de la amiba.

## G. Objetivos

El hecho de que E. invadens pueda ser enquistada in vitro en un medio axénico hace a este organismo un modelo excelente para el estudio de los cambios morfológicos y funcionales durante la diferenciación de Entamoeba, aunque es obvio que la biología de Entamoeba requiere de mucha investigación y en particular el enquistamiento requiere de un estudio detallado y cuidadoso. En el género Entamoeba se han realizado una gran cantidad de estudios, se conocen muchos aspectos médicos y epidemiológicos, pero sobre su biología aún son muy escasos. En vista de lo anterior, se pensó en la posibilidad de diseñar un sistema de microcultivos, que brindara las condiciones óptimas para la observación en un lapso de tiempo amplio, de los fenómenos involucrados en el comportamiento de Entamoeba, teniendo como objetivos particulares:

- 1) Diseño y fabricación de cámaras ultradelgadas para microcultivos de diferentes especies de Entamoeba.
- 2) Determinación de las condiciones óptimas de empleo de la cámara.
- 3) Desarrollo de microcultivos de Entamoeba invadens y Entamoeba histolytica.
- 4) Determinación de variables importantes durante el crecimiento de Entamoeba invadens y Entamoeba histolytica en la cámara.
- 5) Inducción del enquistamiento de E. invadens, en microcultivos.

## II. MATERIAL Y METODOS

### A. Microorganismos

Entamoeba invadens cepa IP-1 fue adquirida inicialmente del Dr. Louis S. Diamond, de los Institutos Nacionales de Salud, U.S.A., y ha sido cultivada en este laboratorio durante 9 años.

Entamoeba histolytica cepa HM-1:INMS fue adquirida del Centro de Amibiasis, México, y ha sido cultivada en este laboratorio durante 9 años.

### B. 1) Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de Entamoeba invadens y Entamoeba histolytica fue el medio TYI-S-33 (Diamond, 1978). Este medio de cultivo tiene una mezcla de vitaminas (denominada mezcla 107/Tween 80), suero bovino y caldo de cultivo. El caldo de cultivo está compuesto principalmente de Biotriptasa y Glucosa, además de otros componentes, (Tabla 1), la mezcla de vitaminas se preparó a partir de la mezcla de vitaminas 107 descrita por Diamond, (1968); a ésta se le añadió vitaminas B12, ácido 8-lióctico y el detergente Tween 80 disuelto en etanol, (este detergente se añade para solubilizar las vitaminas liposolubles y por ser una fuente de ácido oleico, el cual es utilizado por las amibas), (Diamond et al., 1978), se esterilizó por

TABLA I

COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO TYI-S-33  
(Diamond, 1978)

COMPONENTES	CANTIDAD (g)
Biotriptasa	3
Glucosa	1
Cloruro de Sodio	0.2
Fosfato de Potasio monobásico anhidro	0.06
Fosfato de Potasio dibásico trihidratado	0.131
L-Cisteína	0.1
Acido L-ascórbico	0.02
Citrato férrico amónico	0.00228
Agua	c. b. p. 87 ml

filtración y se conservó en el congelador a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Habitualmente se prepararon 2000 ml de medio: para E. invadens 87% de caldo de cultivo (1740 ml), con un pH 6.8, se esterilizó en autoclave (20 libras, 20 minutos), después de esterilizado se le agregaron 3% de mezcla de vitaminas y 10% de suero bovino. Para E. histolytica 87% de caldo de cultivo (1640 ml), con un pH 6.8, 3% de vitaminas y 15 % de suero bovino. Antes de utilizarse fueron centrifugados a 3000 rpm durante 30 minutos para eliminar partículas insolubles.

## 2) Medios de enquistamiento para E. invadens

Para inducir el enquistamiento de E. invadens se utilizó el método recientemente reportado por Vázquez de Lara-Cisneros y Arroyo-Regovich, (1984), empleando el medio TYI-S-33 (sin glucosa). Otro método para inducir el enquistamiento consistió en el empleo del medio axénico de enquistamiento (AEM), reportado por Rengpien y Balley, (1975), adicionando sacarosa al 1% . (Tabla II).

## C. Mantenimiento de los cultivos

El mantenimiento de los cultivos se llevó a cabo en

TABLA II

Composición del medio axénico de enquistamiento (AEM). para Entamoeba invadens (Rengpien y Bailey, 1975).

COMPONENTES	CANTIDAD g
Tripticasa	5
Extracto de levadura	5
Fosfato de potasio monobásico anhidro	0.25
Fosfato de potasio dibásico anhidro	0.55
Agua	c.b.p. 950 ml
Suero bovino	5 % (v/v)

tubos de ensaye con tapa de rosca de 15ml de capacidad, a los cuales se les adicionó 13 ml de medio de cultivo.

Los tubos se inocularon con 8,000 amibas por ml a partir de un cultivo de 8 días de edad. Este cultivo se colocó en agua con hielo durante 10 minutos para permitir que las amibas pegadas en las paredes se desprendieran y así lograr una suspensión homogénea de amibas; el inóculo se tomó a partir de esta suspensión. Los tubos ya inoculados se cerraron bien y se incubaron en posición horizontal. Los cultivos se transfirieron cada 8 días para mantenerlos en las mejores condiciones de crecimiento.

Para inocular la cámara se tomaron amibas de un cultivo en fase de crecimiento activo, colocándolo previamente en agua con hielo durante 10 minutos, se cargó 1 ml de este cultivo en una jeringa estéril de 10 ml y mediante ésta se inculó la cámara, conectando la jeringa a la aguja hipodérmica y ésta a su vez, al tubo de inóculo de la cámara de cultivo.

#### D. Construcción del dispositivo para microcultivo de

#### Entamoeba

1.- En la construcción de las cámaras ultradelgadas para microcultivo de Entamoeba se utilizaron los siguientes materiales:

a).- Para la fabricación del marco o soporte de la cámara:

- Acrílico
- Resina epóxica

b).- Para la parte óptica de la cámara:

- Portaobjetos y cubreobjetos

c).- Para el sellado de las cámaras:

- Combinaciones de cera de abejas y parafina en diferentes proporciones.
- Barniz transparente para uñas.
- Hule de "silicon".

**2.- El material utilizado para montar y conectar el sistema fue el siguiente:**

- a.- Tubo de teflón de 1 mm de diámetro interior.
- b.- Llave de paso de teflón.
- c.- 2 Matraces de 2000 ml cada uno con boca roscada provistos de 2 tapaderas con rosca de bakelita y de resina epóxica.
- d.- Gas nitrógeno a presión.
- e.- 1 Manómetro de mercurio.
- f.- 1 Microscopio invertido NIKON.

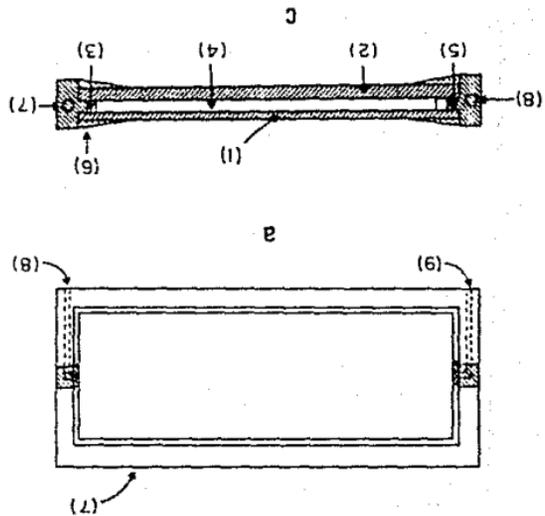
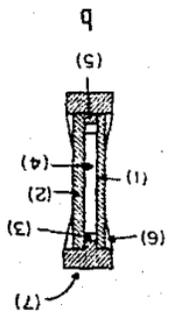
### 3.- Construcción de varios tipos de cámaras de crecimiento .

Las figuras 2,3,y 4, muestran en vista longitudinal y transversal los tres principales tipos de cámaras construidas. La figura 2 muestra la cámara tipo A que se construyó empleando un marco de acrílico sobre el que se fijaron un portaobjetos y un cubreobjetos. Para sellar esta cámara se empleó una mezcla de cera de abejas y parafina. Una vez que la cámara había sido esterilizada las ranuras entre el marco y el portaobjetos y cubreobjetos se llenaron con la mezcla de cera de abejas y parafina fundida.

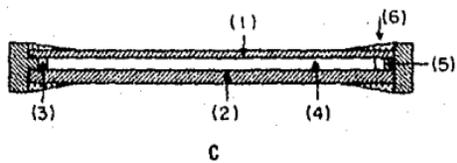
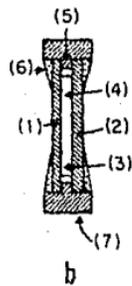
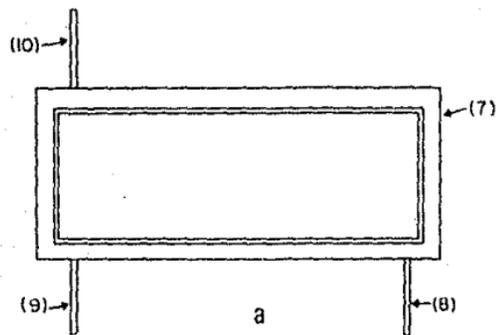
El interior de la cámara se conectó al exterior mediante tubos de teflón insertados en orificios taladrados en los extremos del marco de acrílico; se utilizó también la mezcla de cera de abejas y parafina para tapar el espacio libre entre los tubos de teflón y la pared de los orificios en el marco de acrílico.

La figura 3 muestra la cámara tipo B que se construyó utilizando un marco de resina epóxica semejante al marco de acrílico. Al igual que en el caso del marco de acrílico, se fijaron a él 1 portaobjetos y 1 cubreobjetos. Para ésto se empleó también la mezcla de cera de abejas y parafina para sellar las ranuras entre el marco y el vidrio una vez

**FIGURA No.2.** Cámara para microcultivo de Entamoeba tipo A. (1), cubreobjetos; (2), portaobjetos; (3), tiras de cubreobjetos; (4), cavidad de la cámara; (5), pestaña de acrílico; (6), sellador; (7), soporte de acrílico; (8), comunicación para la alimentación de la cámara; (9), comunicación para la descarga de medio de desechos. Se observa: vista frontal de la cámara (a), vista transversal de la cámara (b) y vista longitudinal de la cámara (c).



**FIGURA No.3.** Cámara para microcultivo de Entamoeba tipo B. (1), cubreobjetos; (2), portaobjetos; (3), tiras de cubreobjetos; (4), cavidad de la cámara; (5), pestaña de resina epóxica; (6), sellador; (7), soporte de resina epóxica; (8), tubo de alimentación de la cámara; (9), tubo para la introducción del inóculo; (10), tubo de descarga. Se observa : vista frontal de la cámara (a), vista transversal de la cámara (b) y vista longitudinal de la cámara (c).



que todos los componentes habían sido esterilizados.

Otro sellador empleado para sellar esta cámara fue el barniz transparente para uñas.

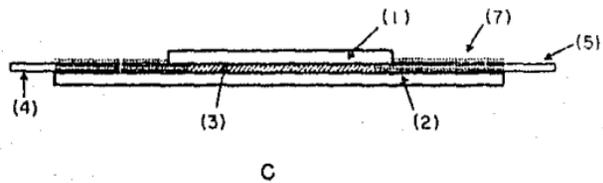
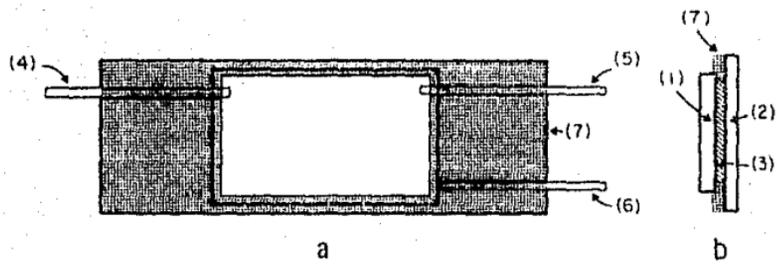
El interior de la cámara se conectó al exterior mediante tubos de acero inoxidable obtenidos a partir de agujas hipodérmicas del número 20 que se insertaron en orificios practicados en los extremos del marco de resina epóxica. Para fijar los tubos al marco se empleó resina epóxica como adhesivo.

La figura 4 muestra la cámara tipo C que se construyó sin marco de soporte empleando como soporte principal un portaobjetos, sobre éste se colocó otro portaobjetos, de menor longitud. Para esta cámara se empleó hule de "silicon" para adherir los dos portaobjetos y para sellar el espacio comprendido entre ellos. El interior de la cámara así formada se conectó al exterior mediante tubos de acero inoxidable semejantes a los empleados en la construcción de la cámara tipo B, los cuales se insertaron entre los portaobjetos, utilizándose también hule de "silicon" para fijarlos en su sitio.

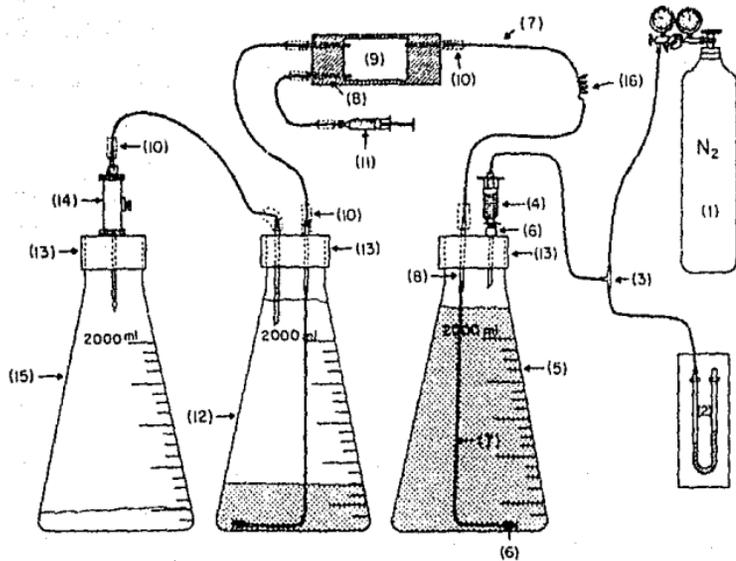
#### 4.- Armado y funcionamiento del sistema de microcultivo.

La figura 5 muestra en forma esquemática el dispositivo que se encontró más conveniente para realizar el microcultivo de Entamoeba.

**FIGURA No.4.** Cámara para microcultivo de Entamoeba tipo C. (1), portaobjetos superior; (2), portaobjetos inferior; (3), cavidad de la cámara; (4), tubo de descarga; (5), tubo de alimentación de la cámara; (6), tubo para la introducción del inóculo; (7), sellador. Se observa : vista frontal de la cámara (a), vista transversal de la cámara (b) y vista longitudinal de la cámara (c).



**FIGURA No. 5** . Sistema completo para el microcultivo de Entamoeba. (1), tanque de gas nitrógeno a presión; (2), manómetro de mercurio; (3), conexión T; (4), Conexión con trampa de algodón estéril; (5), matraz de alimentación; (6), aguja metálica de acero inoxidable; (7), tubería de teflón; (8), tubos de acero inoxidable; (9), cámara ultradelgada; (10), mangos de protección; (11), reservorio de inóculo; (12), matraz con trampa de agua; (13), tapas roscadas; (14), llave de paso de teflón; (15), matraz de descarga; (16), serpentín metálico.



Una cámara tipo C se conectó a matraces de alimentación y descarga por medio de tubos de teflón. El matraz de alimentación se conectó al tubo de entrada de la cámara (4), el matraz de descarga se conectó al tubo de salida de la cámara (5). Al tubo de inóculo de la cámara (6), se conectó mediante un tubo de teflón una aguja hipodérmica metálica del número 20, (figura 4). El matraz alimentador se conectó a un tanque de nitrógeno provisto de regulador de presión. En un ramal de esta tubería se conectó un manómetro de mercurio. A la salida del matraz colector de descarga de ésta se conectó a un tercer matraz receptor final de descarga del sistema. Una vez armado el dispositivo, se esterilizó en un autoclave a 120°C durante 20 minutos.

#### **E. Estimación del crecimiento de la población de amibas.**

El crecimiento de las amibas en la cámara de cultivo que se encuentra siempre en el interior del microscopio invertido NIKON, se estimó mediante su conteo a intervalos de tiempo en un rango de 10-24hrs con la ayuda de la retícula de cuadrados de 1mm por lado, grabada en la cara inferior de la cámara. Se tomaron fotografías de los cultivos en desarrollo utilizando una cámara fotográfica NIKON FEZ modelo M-12 adaptada al microscopio invertido NIKON. Se empleó la película Tri-X-pan 400. Las fotografías fueron tomadas durante el crecimiento de los

cultivos para tener un registro gráfico de la apariencia de los organismos en crecimiento en la cámara.

#### F. Procedimiento para los experimentos de enquistamiento.

En los experimentos para la inducción del enquistamiento de Entamoeba invadens se utilizaron dos matraces de alimentación, uno conteniendo el medio de crecimiento (TYI-S-33) y el otro conteniendo el medio de enquistamiento. Estos matraces se conectaron a la cámara de microcultivo mediante tubería de teflón y una T de vidrio. Mediante esta conexión T fue posible comunicar a cualquiera de los dos matraces a la cámara de microcultivo. El resto del sistema se mantuvo sin modificaciones. Los experimentos realizados para la inducción del enquistamiento de E. invadens se llevaron a cabo en el sistema de microcultivo de Entamoeba. El inóculo inicial para los experimentos de enquistamiento fue de 1500 a 3400 amibas, las cuales se dejaron duplicar por 3 a 5 generaciones. A tiempo cero se indujo su enquistamiento mediante el cambio del medio de crecimiento por el medio de enquistamiento reportado por Vázquez de Lara-Cisneros y Arroyo-Regovich, (1984), este medio de enquistamiento se dejó circular en la cámara durante 48hrs para inducir el enquistamiento de las amibas. Otro medio de enquistamiento que se empleó fue el método reportado por Rengpien y Bailey, (1975), adicionando 1g de sacarosa por cada 100ml de medio. Otro procedimiento empleado para la

Inducción del enquistamiento consistió en que a tiempo cero se cambió el medio de crecimiento por uno de los dos medios de enquistamiento descritos anteriormente dejándose que circulara por la cámara hasta que se recambiara por lo menos 10 veces el medio contenido en ésta. A continuación se detuvo el flujo del medio por la cámara manteniéndose en estas condiciones durante 38hrs para inducir el enquistamiento.

#### G. Estimación del enquistamiento de *E. invadens*

##### *invadens*

Para estimar el enquistamiento de *E. invadens* se tiñeron los quistes con Calcofluor M2R al 1% de acuerdo al método de Arroyo-Begovich *et al.* (1980 a ); los métodos empleados para juzgar el porcentaje de enquistamiento fueron : utilización de detergentes, (para romper las membranas celulares de los trofozoítos y de esta manera separar a los quistes de los trofozoítos presentes), apariencia morfológica, observación de los 4 núcleos con microscopio de contraste de fases, (Arroyo-Begovich *et al.*, 1980 b).

#### H. Limpieza del sistema.

Para limpiar el interior de las cámaras se utilizaron solventes orgánicos: etanol, metanol y formol, también se usaron 2 tipos de detergentes: BRIJ 36T (Polioxietileno-10-lauril-eter) a una concentración del 0.1 % y SDS (Dodecil sulfato de Sodio) en una concentración del 1% . El resto del sistema se lavó muy bien con detergente líquido Extran (Merck).

### III. RESULTADOS

#### A. Dispositivo para el microcultivo de Entamoeba.

1. **Construcción:** En la construcción de las cámaras para microcultivo de Entamoeba se tomaron en cuenta varios tipos de materiales disponibles. Se necesitaba un material fácil de conseguir, de manipular y resistente a esterilizaciones repetidas.

Para la parte óptica se utilizaron cubreobjetos y portaobjetos comunes.

Para las conexiones se empleó tubería de teflón y para el marco o soporte se probó acrílico, resina epóxica o vidrio.

a) **Acrílico.**- La primera cámara que se construyó fue la tipo A, (fig. 2). Se empleó acrílico como soporte de la cámara, la parte óptica se formó con un portaobjetos y un cubreobjetos, entre los cuales se dispusieron unas tiras de vidrio cortadas a partir de un cubreobjetos. Esto para espaciar el portaobjetos del cubreobjetos y así formar una cámara con un espesor igual al del cubreobjetos.

Para hacer que el medio de cultivo circulara por la tubería y por la cámara se empleó presión hidrostática la cual se obtuvo levantando el matraz que contenía el medio de cultivo fresco por encima del nivel del orificio de

descarga; y para purgar de aire el sistema se empleó una jeringa con la que se succionó el aire y algo de medio de cultivo fresco hasta lograr que el sistema quedara libre de burbujas. A continuación el flujo se ajustó variando la altura del matraz de alimentación con respecto del nivel del orificio de descarga. Para inocular la cámara se introdujo el tubo de teflón de descarga a un tubo de cultivo enfriado previamente en agua con hielo durante 10 minutos, y con la ayuda de la succión generada por un desnivel hidrostático se permitió la entrada del inóculo. La utilización de este procedimiento puso de manifiesto un problema importante. Debido a que el movimiento del medio a través de la tubería y de la cámara era forzado por la succión causada por el desnivel hidrostático, se produjo la formación de pequeñas burbujas o émbolos gaseosos que actuaban como tapones impidiendo el flujo del medio por la tubería de teflón. Para resolver este problema se recurrió a forzar el flujo del medio mediante el aumento de la presión con nitrógeno del matraz de alimentación regulando el flujo del medio combinando la variación de la presión del gas con el control del gasto en el tubo de descarga mediante una llave de paso.

Al principio se trabajó con una presión relativamente pequeña (2 cm Hg), y la cámara funcionó bien por un tiempo corto, después de nuevo apareció el problema de los émbolos gaseosos debido a que era demasiado pequeña la presión ejercida en el medio nutritivo.

Entonces se aumentó la presión ( 5 cm Hg) para evitar la formación de dichos émbolos y ésto provocó la fractura de una de las cámaras. El cubreobjetos se deshizo debido a que es una placa de vidrio muy delgada; y en aquellos casos en los que las paredes de vidrio de la cámara se mantuvieron intactas se observó desprendimiento de los sellos hechos con parafina y cera de abejas resultando en fugas del medio.

Los resultados anteriores nos llevaron a la necesidad de cambiar el material de sellado. El sistema se armó ahora usando barniz de uñas transparente como material de sellado. También con este material se produjeron fugas en los espacios libres entre los tubos de teflón y la pared de los orificios en el marco de acrílico. Conjuntamente con este problema se observó que en los marcos de soporte fueron apareciendo grietas debido a las repetidas esterilizaciones a las que se sometieron y a las diferentes sustancias utilizadas para su limpieza; estas grietas ofrecieron una puerta para la entrada de contaminantes a la cámara y para fugas del medio de cultivo.

Los problemas observados en el empleo del soporte de acrílico llevaron a la sustitución de este material.

## b) Resina epóxica.-

Se construyó otro soporte para la cámara para microcultivo de Entamoeba a base de resina epóxica.

La cámara tipo B (fig.3) se obtuvo haciendo una reproducción de la cámara de acrílico mediante la técnica de vaciado. Este tipo de cámara se probó utilizando los materiales de conexión y de adhesión que ya se habían experimentado en la cámara anterior.

Uno de los primeros problemas observados fue que había fugas en los espacios libres entre el material óptico (vidrio) y la pared de los orificios en el marco de resina epóxica. El empleo de barniz de uñas transparente dio problemas semejantes.

Al esterilizar estas cámaras después de repetidas veces se observó que se deformaban, por lo que para evitar esto se colocaron entre 2 placas de vidrio con el objeto de que al calentarse durante la esterilización no se doblaran, sin embargo, a pesar de esta precaución sufrieron deformaciones progresivas. Aún con los problemas anteriores, este tipo de cámara se utilizó para experimentar el uso de dos portaobjetos para conformar la parte óptica, ya que los portaobjetos son más resistentes que los cubreobjetos y por lo tanto menos susceptibles a fragmentarse por la presión ejercida por el medio de cultivo. Con esta modificación se observó un mejor funcionamiento de la cámara. En este tipo de cámara se

utilizaron tubos de acero inoxidable para la conexión de la cámara al exterior, aumentándose en uno el número de conexiones. Originalmente cada cámara tenía sólo dos comunicaciones: la entrada y la salida para el medio de cultivo. Se hizo otra comunicación para la entrada del inóculo, para que esta fuera más directa y así, se tuviera menor posibilidad de contaminación.

Para solucionar el problema de la contaminación ocasional se agregaron uno o varios antibióticos al medio de cultivo (Tabla III). Los antibióticos fueron esterilizados por filtración con filtro Millipore (poros de 0.22  $\mu$ m).

#### c.- Vidrio

En vista de los problemas anteriores se procedió a la fabricación de la cámara tipo C. Esta cámara se construyó sin marco de soporte (fig. 4). Se utilizó otro sellador, el hule de "silicon".

Esta cámara se construyó con 2 portaobjetos unidos entre sí con hule de "silicon". La comunicación con el interior la cámara se estableció mediante 3 tubos de acero inoxidable sujetos entre los 2 placas de vidrio con hule

TABLA III

Antibióticos que se emplearon para prevenir la contaminación de los microcultivos.

ANTIBIOTICOS	CONCENTRACION EN µg/ml
Estreptomicina + Penicilina G.	2.5 c/u
Sulfato de Kanamicina (Kanamimicina)	2.5
Clorhidrato de Dimetil clor- tetraciclina (Ledermicina)	2.5
Ampicilina trihidratada (Binotal)	2.5
Cefadroxil Monohidratado (Cefamox)	2.5

de "silicon ". Se observó que al ser esterilizada no se modificaban las propiedades y características de estas cámaras y no se produjeron fugas del medio de cultivo y el hule de "silicon " no se desprendió.

## 2. Determinación de las condiciones óptimas.

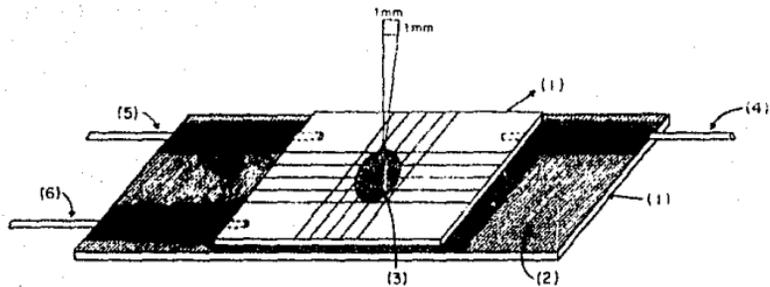
Los factores que se consideraron más importantes para el funcionamiento de la cámara de microcultivo son: velocidad de flujo del medio de cultivo, temperatura de la cámara, velocidad de crecimiento celular, esterilidad y limpieza del sistema.

Inicialmente para el control de la velocidad de flujo se utilizó una llave de paso situada en el punto de descarga del medio de desecho. Sin embargo, se observó que esta llave se tapaba progresivamente por la acumulación de materiales insolubles y precipitados presentes en el medio. Por ésto se ensayó el control del gasto del medio mediante el control de la salida del aire del matraz donde se colectaba el medio de desecho. Esto tampoco dio buenos resultados ya que el aire se comprime con facilidad y su volumen es cambiante, contrayéndose con el frío y expandiéndose al aumentar la temperatura, etc., por lo que el flujo no se pudo mantener constante llegándose a detener ocasionalmente durante el transcurso del día.

Se decidió colocar un matraz conteniendo agua bidestilada estéril para recibir en el fondo de éste la descarga del material de desecho y, de esta forma desplazar el agua contenida en el matraz. El agua desplazada abandona este matraz por medio de un tubo de teflón el cual está provisto de una llave de paso para regular el flujo de la salida de ésta. El agua al ser menos densa que el medio de crecimiento es desplazada del matraz y como no tiene partículas o precipitados en suspensión que puedan tapar la llave de control de descarga la velocidad de flujo se controló con gran eficacia.

La temperatura de los microcultivos se mantuvo de acuerdo a cada especie mediante el empleo de un incubador integrado al microscopio. Este incubador estaba provisto de un termostato. Para evaluar el crecimiento de las amibas se construyó una retícula practicando un rayado en el portaobjetos que forma el fondo de la cámara. El área de la retícula construida fue de  $444\text{mm}^2$ , 37 cuadros de largo (37mm) por 12 cuadros de ancho (12 mm); considerando que la cámara tipo C tiene una profundidad de 1mm, el volumen total de la cámara fue de  $444\text{mm}^3$ , (figura 6). La eficacia del sistema de microcultivo se evaluó primero con inoculaciones de un número reducido de organismos (4-10 amibas) para observar la distribución de estos dentro de la cámara, el crecimiento poblacional de acuerdo a la temperatura, el tiempo de cultivo, la presión y el flujo del medio de crecimiento en la cámara.

**FIGURA.6** Cámara ultradelgada tipo C. Muestra un detalle de la retícula construida en la superficie de la cara inferior de la cámara. La retícula está formada por cuadros de 1mm de lado. El volumen interior de la cámara es de  $444\text{mm}^3$ . (1), Portaobjetos; (2), sellador; (3), detalle de la retícula; (4), tubo de alimentación de la cámara; (5), tubo de descarga; (6), tubo para la introducción del inóculo.



En cuanto a la limpieza del sistema, el interior de la cámara se limpió utilizando 2 detergentes: el RRIJ 36T y el SDS. El resto del sistema se lavó muy bien con detergente líquido Extran. Se observó que el empleo de estos detergentes no deja residuos que dañen el desarrollo de los cultivos.

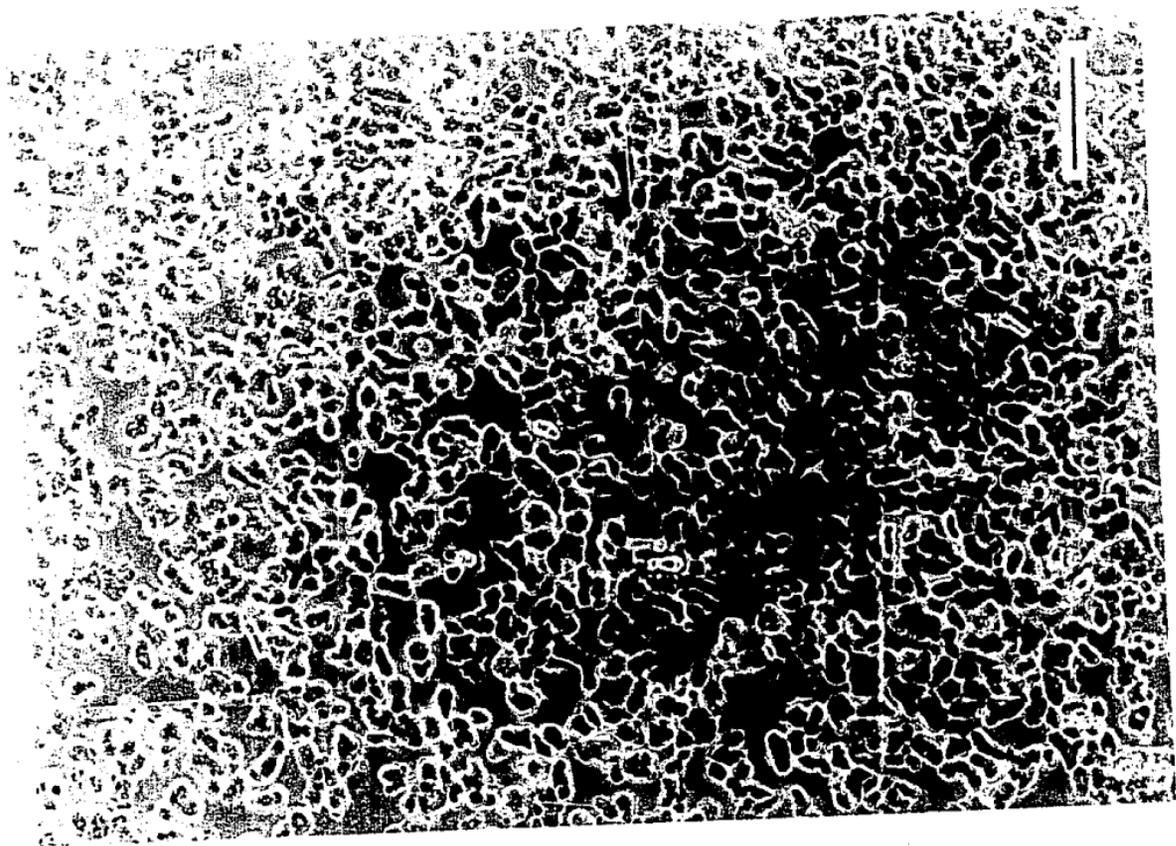
### B. Desarrollo de microcultivos de Eutimaeba.

#### 1. Determinación de las variables principales para el crecimiento de Eutimaeba en la cámara:

Se realizaron una serie de pruebas para determinar cual era el flujo óptimo en la cámara, estas pruebas se hicieron considerando un rango de flujo de 1-12 gotas/minuto, (25 gotas/ml). Al probar el flujo en un rango de 1-3 gotas/minuto se observó que las amibas crecían bien a esta velocidad de flujo pero, como el flujo era lento el precipitado y el material insoluble del medio de cultivo se acumuló en la cámara. Se probó también el rango de 4-8 gotas /minuto, como en el caso anterior se observó que a esta velocidad de flujo, las amibas crecían bien sin que éstas fueran arrastradas al mismo tiempo que no se produjo acumulación del material insoluble del medio de cultivo. Por último, se probó el rango de 9-12 gotas/minuto, en estas condiciones el crecimiento de las amibas se vio afectado en cuanto a su distribución en la

cámara acumulándose cerca del tubo de salida del medio, sin embargo, éstas tampoco fueron arrastradas por el medio de cultivo. Se necesitó aumentar el flujo 4 veces (32 gotas/minuto), para que el 5% de la población comenzara a ser arrastrada. De acuerdo con los resultados anteriores se decidió utilizar el flujo de 4 - 8 gotas/minuto para todos los experimentos siguientes. En general una presión de 2-4mm Hg aplicada a la superficie del medio fresco fue suficiente para mantener un flujo de 0.16 a 0.32 ml/minuto (4 - 8 gotas/minuto) en el sistema. Para tener un mejor punto de referencia y para poder estimar la distribución de las amibas en la cámara de microcultivo durante su crecimiento y multiplicación, la cámara de microcultivo se dividió en 4 cuadrantes. Los primeros experimentos se realizaron con E. invadens debido a su fácil manipulación y manejo. Se llevaron a cabo 9 experimentos de crecimiento con esta amiba en donde el número de amibas en el inóculo inicial se varió de 12 a 1119, en donde el tiempo de generación medio varió de 26-28hrs. Se tomaron fotografías durante el desarrollo de los microcultivos para obtener un registro gráfico de las características de las células en crecimiento en la cámara. la figura 7 muestra un cultivo representativo de E. invadens en crecimiento en la cámara 36hrs después de haberse inoculado 250 amibas. Se puede observar también parte de la retícula grabada en la cámara de microcultivo. El inóculo inicial en la mayoría de los experimentos de

**Figura.7.** Aspecto microscópico en contraste de fases de un microcultivo de Entamoeba invadens 36hrs después de haberse inoculado 250 amibas. Las amibas exhiben una morfología normal, se aprecia claramente la membrana celular y el citoplasma granular. La presencia de pseudópodos indican que los trofozoítos estaban en movimiento. La distribución de las amibas en la cámara fue uniforme como se puede apreciar. El rayado que se observa corresponde a una parte de la retícula grabada en el fondo de la cámara. Barra = 100  $\mu$ m.

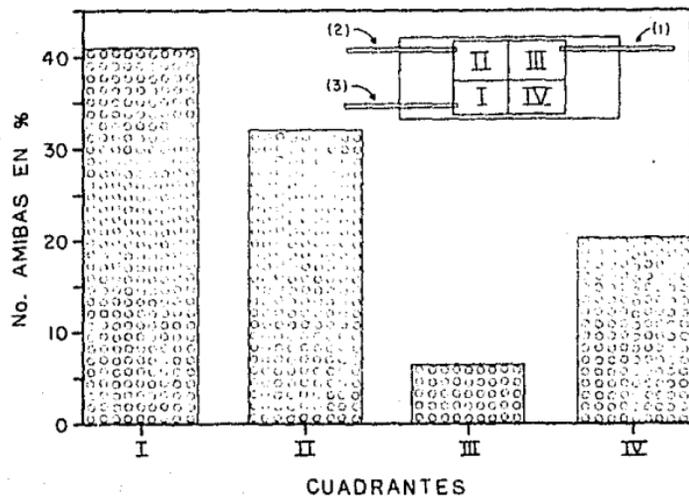


crecimiento fue pequeño para poder observar el crecimiento y la distribución de estos organismos durante un tiempo largo. Cuando se inocularon 24 amibas la distribución de éstas a los 7 días de crecimiento activo se muestra en la figura 8. Las barras del histograma indican que a este tiempo las amibas en crecimiento se localizaron preferencialmente en los cuadrantes I y II que son los que están cerca del tubo de inóculo y del tubo de salida del medio, y conforme progresa el cultivo su distribución se extiende hasta abarcar los siguientes cuadrantes. Cuando el inóculo de E. invadens fue de 1119 amibas, 4 días de crecimiento activo fue tiempo suficiente para que la distribución de las amibas en la cara inferior de la cámara alcanzara a formar una monocapa confluyente, lo cual indica que conforme progresa el cultivo su distribución se extiende hasta abarcar todos los cuadrantes.

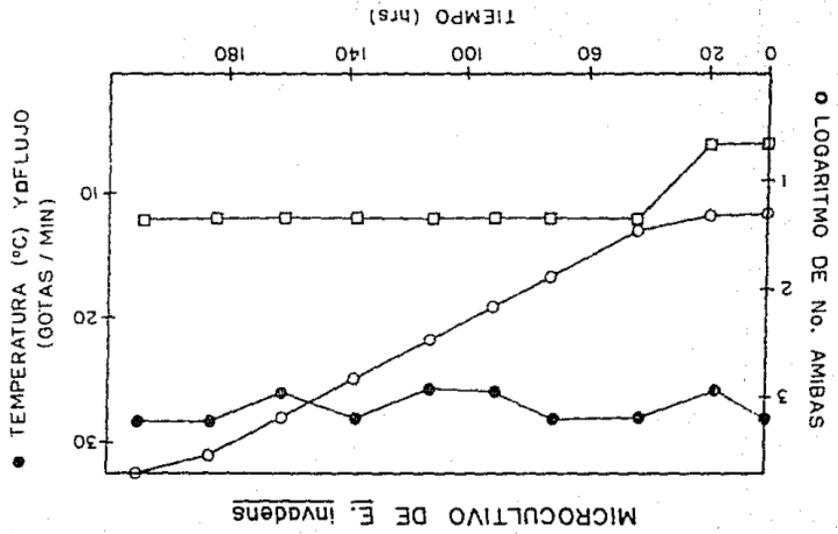
Durante el desarrollo de los microcultivos se registraron datos del número de amibas, velocidad de flujo del medio de cultivo en la cámara y, la temperatura de crecimiento, (figura 9). En algunos casos E. invadens se mantuvo sin crecer durante las primero 24-36hrs, al cabo de las cuales inició su multiplicación siguiendo una cinética exponencial. El tiempo aparente de generación medio que se observó para E. invadens fue de 26-28hrs. En el desarrollo de los microcultivos de E. invadens se utilizó un incubador integrado al microscopio para mantener la temperatura de crecimiento a 26°C. Como no se tenía la

**FIGURA.8.** Distribución de Entamoeba invadens en la cámara ultradelgada. El inserto muestra la localización de los cuadrantes en los que se dividió la cámara. (1), tubo de alimentación; (2), tubo de descarga; (3), tubo de inóculo. El cuadrante I se localiza frente al tubo de inóculo; el cuadrante II se localiza frente al tubo de descarga; el cuadrante III se localiza frente al tubo de alimentación y el cuadrante IV se localiza colindante a los cuadrantes I y III. Las barras del histograma representan la distribución de las amibas (% del total de amibas), en la cámara a los 7 días después de inocular 24 amibas.

### DISTRIBUCION DE ENTAMOEBA EN CAMARA DE MICROCULTIVO



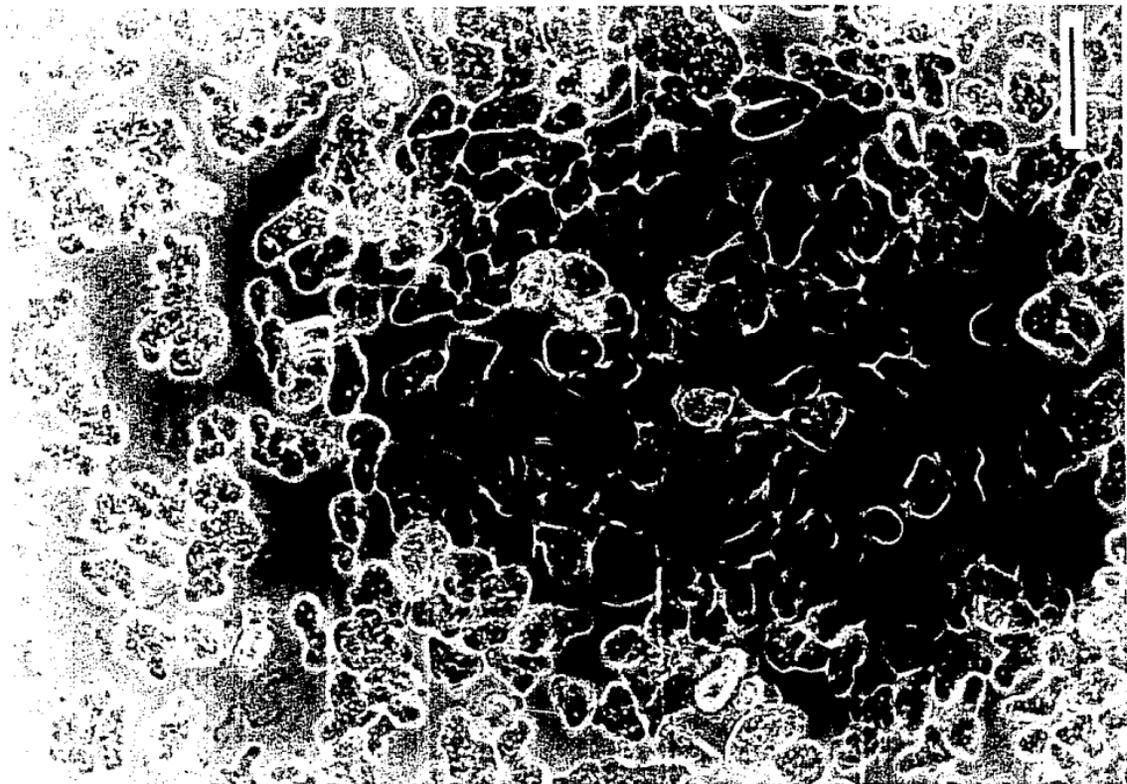
**FIGURA 9.** Curva de crecimiento de *E. invadens*. Se registró el flujo del medio de cultivo a la cámara, y la temperatura de crecimiento. El inóculo inicial en este microcultivo fue de 598 amibas. La gráfica muestra un cultivo con 46hrs de crecimiento activo. o número de amibas; ● Temperatura en °C; □ Flujo del medio de cultivo en gotas por minuto.



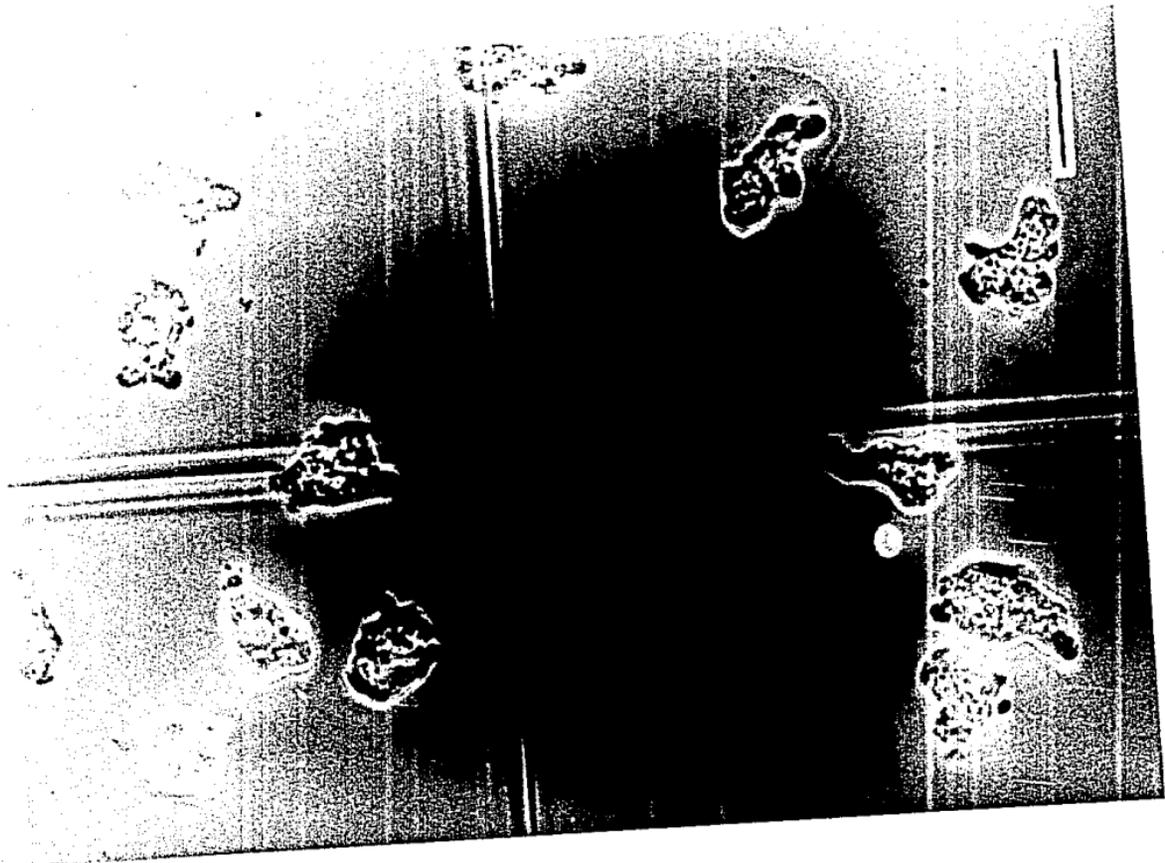
posibilidad de medir la temperatura de la cámara de microcultivo en una forma directa se decidió colocar un serpentín metálico a la mitad de la longitud de la tubería de teflón que lleva el medio de cultivo a la cámara, el serpentín se mantuvo sumergido en un vaso de precipitados que contenía mercurio para que al fluir por él el medio de cultivo se calentara y pudiera mantenerse constante la temperatura de éste durante el crecimiento de E. invadens. El vaso de precipitados (20ml de capacidad), conteniendo mercurio, un termómetro y, sumergido en él un serpentín metálico colocado en la corriente de aire caliente que mantiene estable la temperatura del incubador adaptado al microscopio.

En los experimentos realizados con E. histolytica inicialmente se inoculó un número pequeño de amibas para observar su crecimiento y distribución durante un tiempo largo. Se realizaron 6 experimentos de crecimiento con E. histolytica en donde el número de amibas en el inóculo se varió de 5 a 485 y el tiempo de generación medio fue de 23 - 24hrs. Se tomaron fotografías del crecimiento de los organismos en la cámara de microcultivo. La figura 10 muestra un cultivo de E. histolytica creciendo en la cámara 32hrs después de haberse inoculado 180 amibas. Se puede observar también parte de la retícula grabada en el fondo de la cámara de microcultivo. En la figura 11 se muestra un cultivo de E. histolytica creciendo en la cámara de microcultivo 24hrs

**Figura 10.** Aspecto microscópico en contraste de fases de un microcultivo de Entamoeba histolytica 32hrs después de haberse inoculado 180 amibas. Las amibas exhiben una morfología normal, se aprecia claramente la membrana celular rodeando al citoplasma granular con gran capacidad para fluir en todas direcciones. En general el cultivo presenta uniformidad morfológica. Las flechas indican la presencia de los aglomerados incipientes de amibas que se forman aún sin que se haya producido una monocapa confluyente. El rayado que se observa corresponde a una parte de la retícula grabada en el fondo de la cámara. Barra = 50  $\mu$ m.



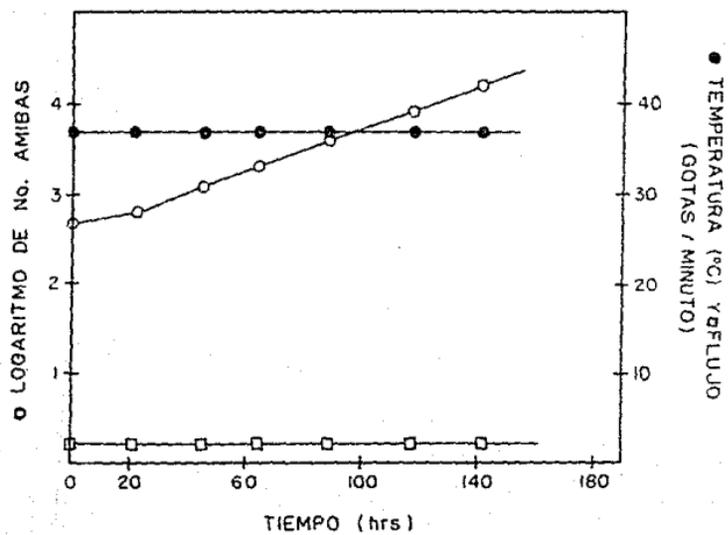
**Figura 11.** Aspecto microscópico en contraste de fases de un microcultivo de Entamoeba histolytica 24hrs después de haberse inoculado 50 amibas. Las amibas exhiben uniformidad morfológica, se aprecia claramente su membrana celular y su citoplasma granular. La presencia de múltiples pseudópodos indican que las amibas estaban en movimiento. El rayado que se observa corresponde a una parte de la retícula grabada en el fondo de la cámara. Barra = 25  $\mu$ m.



después de haberse inoculado 50 amibas. En ambas fotografías las amibas exhiben características normales tanto respecto a su morfología como respecto a su movilidad. La distribución de E. histolytica en la cámara al cabo de 3 días de crecimiento activo cuando el inóculo inicial fue de 180 amibas, fue similar a la observada para E. invadens localizándose éstas preferencialmente en los cuadrantes I y II que son los que están cerca del tubo de inóculo y del tubo de salida del medio y conforme progresó el cultivo su distribución se extendió hasta abarcar los siguientes cuadrantes, sin embargo, E. histolytica mostró tendencia a formar aglomerados aun antes de que se formara una monocapa confluyente. Cuando el inóculo de E. histolytica fue de 485 amibas, 5 días de crecimiento activo fue tiempo suficiente para que la distribución de las amibas ocupara el total del volumen interior de la cámara (444mm<sup>3</sup>). Se registraron datos del número de amibas, velocidad del flujo del medio de cultivo en la cámara y, la temperatura de crecimiento, (figura 12). También se observó que E. histolytica se mantuvo sin crecer durante las primeras 24-36hrs, al cabo de las cuales inició su multiplicación siguiendo una cinética exponencial. El tiempo aparente de generación medio para esta amiba fue de 23-24hrs. La temperatura de crecimiento de E. histolytica se mantuvo también empleando el incubador integrado al microscopio y el serpentín metálico sumergido en mercurio para calentar el medio de cultivo en

**FIGURA.12.** Curva de crecimiento de E. histolytica. Se registró el flujo del medio de cultivo a la cámara y la temperatura de crecimiento. El inóculo inicial fue de 485 amibas y el número final fue de 16,512 amibas. La gráfica muestra un cultivo con 120hrs de crecimiento activo. ○ número de amibas; ● Temperatura en °C; □ Flujo del medio de cultivo en gotas por minuto.

# MICROCULTIVO DE E. histolytica



este caso a 37°C. El flujo del medio de cultivo se mantuvo durante la mayoría de los microcultivos de esta especie a 4 gotas/minuto, (0.16ml/minuto). En general una vez que pasó la etapa inicial de crecimiento lento los microcultivos tanto de E. invadens como de E. histolytica aumentaron en número siguiendo una cinética exponencial. Se mantuvieron los cultivos continuos por más de 30 días sin que se presentara contaminación.

### C. Inducción del enquistamiento de Entamoeba invadens en microcultivos.

Los factores tanto nutricionales como ambientales que controlan el enquistamiento de Entamoeba cultivada in vitro han sido estudiados esporádicamente a lo largo del tiempo. Dentro de los factores que se han considerado como participantes en el fenómeno de enquistamiento están la disminución en la cantidad de nutrientes, el acúmulo de catabolitos y el aumento en la densidad celular, (Mc Connachie, 1969). Se describió un método para inducir el enquistamiento de E. invadens en condiciones axénicas (Rengpien y Bailey, 1975; Bailey y Rengpien, 1980), basado en la disminución de la osmolaridad del medio. Estos autores concluyeron que el choque osmótico es el principal factor que controla el enquistamiento. Recientemente se describió otro método para inducir el enquistamiento de E.

Invadens en condiciones axénicas (Vázquez de Lara-Cisneros y Arroyo-Begovich, 1984). Este método consiste en el empleo del medio habitual de crecimiento para trofozoitos pero desprovisto de glucosa. Estos autores encontraron que cuando la glucosa se omitía en el medio de crecimiento éste aún tenía de 100-250µg/ml de esta hexosa debido a la glucosa presente en el suero bovino. Estos mismos autores realizaron experimentos para probar si la fuente de carbono en el medio influía en la inducción del enquistamiento de estos organismos para lo cual, emplearon células creciendo activamente en medio normal, transfiriéndolas después a diferentes medios, bien en ausencia de glucosa que es la fuente principal de carbono del medio normal o bien donde la glucosa fue sustituida por sacarosa, sorbosa, glicerol, acetato, lactato o N-acetilglucosamina. Se observó que en ausencia de glucosa el enquistamiento en un cultivo fue masivo. Los resultados fueron similares cuando se añadió sacarosa o sorbosa en lugar de glucosa. Todos estos estudios fueron realizados en sistemas cerrados, por esta razón nos interesó ensayar la inducción del enquistamiento de E. invadens en un sistema abierto en donde el medio de enquistamiento presenta características constantes. El desarrollo de microcultivos continuos de Entamoeba en cámara ultradelgada bajo condiciones muy controladas hizo posible el ensayo del enquistamiento de E. invadens en presencia de un medio de enquistamiento de características constantes. Se

realizaron 5 experimentos de enquistamiento de *E. invadens* en donde el número inicial de amibas fue de 1500 a 3400, dejándose duplicar éstas por 3 a 5 generaciones y a tiempo cero se indujo su enquistamiento mediante el cambio del medio de crecimiento por el medio de enquistamiento. El primer medio de enquistamiento que se utilizó fue el medio TYI-S-33 desprovisto de glucosa, de acuerdo al método reportado por Vázquez de Lara-Cisneros y Arroyo-Regovich, (1984). Se empleó un cultivo con un inóculo inicial de 1500 amibas el cual se dejó duplicar por 4 generaciones y a tiempo cero se indujo su enquistamiento mediante el cambio del medio de crecimiento por el medio de enquistamiento anteriormente descrito. Este medio de enquistamiento se dejó circular en la cámara durante 48hrs para inducir el enquistamiento de la amiba. En estas condiciones se observó la aparición de un porcentaje bajo de quistes obteniéndose solo un 3% del total de las células presentes en el microcultivo al tiempo de inducir el enquistamiento. Este porcentaje fue muy bajo comparado con el 70-90% reportado por Vázquez de Lara-Cisneros y Arroyo-Regovich en 1984. De acuerdo a los resultados anteriores y a la observación de los autores mencionados anteriormente el medio de enquistamiento aún contenía de 100-250µg/ml de esta hexosa, se decidió primero permitir que las amibas se expusieran al medio de enquistamiento bajo flujo constante durante 2hrs y segundo, se detuvo totalmente el flujo de este medio para

permitir que las amibas utilizaran la glucosa residual y la agotaran. En estas condiciones se esperaba detectar un aumento en el porcentaje de quistes producidos. Empleando un cultivo con un inóculo inicial de 1800 amibas, se dejó duplicar éste por 5 generaciones y a tiempo cero se indujo su enquistamiento cambiando el medio de crecimiento por el medio de enquistamiento bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Los resultados obtenidos indican que el porcentaje de quistes producidos fue semejante al obtenido previamente, al parecer no basta con eliminar la glucosa del medio para que las amibas se enquisten eficientemente. Se decidió probar también el medio de enquistamiento reportado por Rengpien y Bailey, (1975), agregando de 1g de sacarosa por cada 100ml de medio. De acuerdo con lo anterior se utilizó este método de enquistamiento en un cultivo con un inóculo inicial de 2500 amibas el cual se dejó duplicar por 3 generaciones y a tiempo cero se indujo su enquistamiento cambiando el medio de crecimiento por el medio de enquistamiento. Este medio se dejó fluir en la cámara de microcultivo por 48hrs sin que se observara cambio en el rendimiento de quistes. Se formó solo un 5% del total de quistes esperados. Considerando que en los cultivos viejos se puede observar la presencia de quistes y, que quizás la señal para iniciar el enquistamiento sea una señal de origen químico que necesite acumularse en el medio de enquistamiento que circunda a las amibas, se decidió probar de nuevo el

mismo medio de enquistamiento dejando ahora que el cultivo continuara sin la circulación del medio. En un cultivo con un inoculo inicial de 3400 amibas, se permitió que éstas se duplicaran por 3 generaciones y a tiempo cero se indujo su enquistamiento mediante el cambio del medio de crecimiento por el medio de enquistamiento dejando circular éste hasta que se recambió 10 veces el volumen total de la cámara de microcultivo y a continuación el flujo del medio se detuvo totalmente. Se dejó al microcultivo sin recambio del medio de enquistamiento durante 38hrs al cabo de las cuales se observó la aparición de quistes también en un porcentaje bajo, solo un 10% del total de quistes esperados. En general los medios de enquistamiento ensayados en los microcultivos para inducir el enquistamiento de E. invadens mostraron resultados semejantes: la producción de un bajo porcentaje de quistes.

#### IV. DISCUSION

Durante muchos años la única forma en la que se han cultivado a las amibas del género Entamoeba ha sido en matraces y tubos de ensaye . Se les ha estudiado desde el punto de vista bioquímico, de su biología celular, inmunológico, epidemiológico, etc. (Maclaughlin y Aley, 1985; Moss y Vesvesvera, 1986; Raudin et al, 1986). Pero aún se desconoce en gran parte como se induce el fenómeno de diferenciación celular para que la amiba se convierta en quiste. El desarrollo del sistema de microcultivo para Entamoeba mediante el empleo de cámaras ultradelgadas de cultivo que se describe se realizó con el fin de mejorar las condiciones de cultivo de este género de amibas manteniendo constante la composición del medio de cultivo sin disminución de sus componentes ni acumulación de productos del catabolismo de la amiba y así facilitar el estudio de la diferenciación de la amiba. Los resultados obtenidos muestran que fue posible construir un dispositivo para el microcultivo de Entamoeba donde las características del medio son constantes. En este trabajo sólo se muestran los 3 principales tipos de cámaras que se construyeron aun cuando se hicieron muchas variantes de ellas. Después de una larga búsqueda del material óptimo para la construcción de las cámaras se obtuvo un resultado satisfactorio con la cámara tipo C. El empleo de la tubería de teflón y del hule de "silicon"

como sellador permitió que la cámara de microcultivo y el resto del sistema pudieran ser esterilizados ya armados evitando de esta forma la contaminación de los cultivos. La cámara ultradelgada tiene paredes ópticamente transparentes y suficientemente delgadas en las que aun los objetivos de alto poder pueden utilizarse para la observación de los organismos, tiene también una retícula grabada en su parte interior como referencia para poder contar a los organismos en crecimiento en su interior, se pueden hacer las conexiones necesarias en el sistema para permitir que el medio en circulación en la cámara pueda ser cambiado por otro, sin que se pierda la esterilidad, la temperatura del medio puede ser controlada con precisión al igual que la velocidad del flujo de éste. La cámara tipo C cumple con las características que se contemplaron desde el principio y sobretodo, el material para su construcción es fácil de conseguir, de manipular y es de precio accesible. En general en diferentes laboratorios el cultivo de las amibas se ha realizado en sistemas cerrados en donde no hay recambio del medio de cultivo, es decir, en donde hay acumulación de los desechos metabólicos de las amibas como por ejemplo ácidos orgánicos y otros catabolitos. El sistema de microcultivo que se describe en este trabajo es un sistema abierto en el cual hay una circulación constante el medio de cultivo en la cámara de microcultivo evitando así la acumulación de desechos propios de la amiba y el agotamiento de los componentes

del medio, pudiéndose mantener cultivos continuos por más de 30 días sin que se presente contaminación alguna. En los cultivos tanto de E. invadens como de E. histolytica se observó un crecimiento lento seguido de una fase de multiplicación rápida. En general en microbiología, los cultivos de microorganismos muestran un crecimiento que puede dividirse en tres fases: la fase lag, la fase exponencial o de crecimiento y la fase estacionaria. El período de tiempo llamado fase lag puede ser breve o extenderse por tiempo largo dependiendo de las condiciones prevalecientes en el cultivo. La fase lag usualmente ocurre cuando las células se ajustan al medio de crecimiento nuevo, este ajuste puede ser debido a que requieren de la producción de las enzimas necesarias para la conversión de los nutrientes presentes en el medio de cultivo en los monómeros necesarios para el metabolismo del organismo mismos que no están presentes en el medio de cultivo nuevo. La duración de la fase exponencial o de crecimiento depende de la temperatura y de la composición del medio de cultivo y, también de las características del organismo mismo, ya que en un sistema cerrado el crecimiento poblacional no puede darse indefinidamente. La fase estacionaria es la fase en la cual no hay un incremento neto en el número de las células aunque algunas pueden continuar con sus funciones incluyendo metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos. La fase estacionaria se extiende indefinidamente o puede estar

seguida por la fase de muerte en la que los organismos del cultivo mueren por diversos factores como por ejemplo por la acumulación de productos de su catabolismo, cambio de pH, etc. (Brock et al., 1966). En contraste en un sistema de cultivo como el que presentamos que es un sistema abierto en el cual las características del medio de cultivo, la temperatura y el flujo del medio de crecimiento son constantes, la fase de crecimiento puede darse indefinidamente. La única limitante es la capacidad de la cámara. Cuando la población de amibas llega a ocupar el total de la cavidad de ésta su cuantificación microscópica se torna imposible, por lo que fue difícil evaluar variaciones en la población de amibas en la cámara una vez que el volumen de ésta quedó ocupado totalmente. La observación de que en los microcultivos de Entamoeba se requieren de 24-36hrs para iniciar su crecimiento, se debe probablemente a que las amibas requieren de un período de inducción en el que éstas formen las enzimas necesarias para sobrevivir adecuadamente en el medio de cultivo que por estar fluyendo exhibe características constantes.

Durante el desarrollo de éste trabajo se establecieron las características que se consideraron importantes tanto para el funcionamiento óptimo del sistema de microcultivo como para el desarrollo de los cultivos continuos en condiciones muy controladas en la cámara de microcultivo, procurando no alterar las

características normales de crecimiento de los organismos, como se puede observar en los microcultivos. Las amibas exhibieron una morfología normal observándose claramente su membrana celular, su citoplasma granular, su núcleo y numerosos pseudópodos. El desarrollo de microcultivos continuos de Entamoeba en las condiciones descritas abrió la posibilidad de investigar la inducción del enquistamiento de E. invadens también bajo la presencia de un medio de enquistamiento de características constantes. Los experimentos realizados para la inducción del enquistamiento de E. invadens exhibieron un rendimiento bajo de quistes, aun cuando se ensayaron los procedimientos que han sido reportados para inducirlo (Rengpien y Bailey, 1975; Vázquez de Lara-Cisneros y Arroyo-Regovich, 1984). Cuando se empleó el medio de enquistamiento reportado por Vázquez de Lara-Cisneros y Arroyo-Regovich, (1984), el porcentaje de quistes producidos fue de 3% del total esperado. Cuando se empleó el método reportado por Rengpien y Bailey, (1975), el rendimiento de quistes obtenido fue de 5-10% del total de quistes esperados. El bajo rendimiento de quistes obtenido en nuestras condiciones de cultivo podría deberse a que el medio de cultivo aún sin la adición de glucosa contiene de 100-250µg/ml de esta hexosa debido a la glucosa presente en el suero bovino. Sin embargo, la presencia de glucosa en el medio de enquistamiento no fue el factor limitante para que la amiba enquistara puesto

que en los experimentos de enquistamiento en los que se dejó a las amibas sin recambio del medio para permitir que éstas agotaran la cantidad de glucosa residual, no se observó la producción masiva de quistes. En los diferentes métodos de enquistamiento que se han reportado se indica que el rendimiento de quistes es máximo cuando las amibas a las que se les va inducir el enquistamiento provienen de un cultivo que se encuentra en el último tercio de la fase de crecimiento activo. Es posible que el bajo rendimiento de quistes que observamos en nuestros experimentos se deba a que las amibas en nuestros cultivos están creciendo activamente y no disminuyendo la velocidad de crecimiento como sucede en el último tercio de la fase de crecimiento activo en un cultivo cerrado.

Aún cuando falta mucho para precisar las condiciones óptimas para inducir el enquistamiento de la amiba en el sistema de microcultivo que se describe, las características de éste habrán de permitir investigar las diferentes variables por separado debido a que la llave de dos vías que se encuentra en el punto de alimentación de medio a la cámara facilita el ensayo de los medios de enquistamiento de diferentes composiciones ya que el medio en circulación en la cámara puede ser cambiado fácilmente por otro sin que se pierda la esterilidad en el sistema de microcultivo.

El sistema de microcultivo de Entamoeba que se describe seguramente permitirá en el futuro ampliar el conocimiento

de la biología de estos organismos, en particular aclarar con precisión cuales son los requerimientos para el empaquetamiento de Entamoeba así como también permitirá la sincronización de la división celular de estos organismos.

## V. CONCLUSIONES

El sistema de cultivo que se desarrolló es una innovación dentro del campo de la investigación de Entamoeba debido a que hasta la fecha no se ha reportado en la literatura ningún trabajo semejante a éste.

El sistema que se diseñó ofrece grandes ventajas para el desarrollo de microcultivos de Entamoeba de duración prolongada sin riesgo de contaminación, debido a que su diseño y el material empleado en su construcción permiten que el sistema pueda ser esterilizado completamente armado.

En este sistema la morfología y crecimiento de las amibas se puede observar microscópicamente en forma continua y mediante la retícula grabada en la cámara de crecimiento se puede determinar cuantitativamente el número de amibas presentes en un tiempo dado.

Una ventaja particularmente importante de este sistema consiste en que se trata de un cultivo continuo donde las características del medio son constantes sin que se agoten componentes de éste o se acumulen productos del catabolismo de las amibas.

El diseño del sistema ofrece la ventaja de poder substituir un tipo de medio por otro con rapidez, sin riesgo de contaminación y sin variación de la velocidad de flujo de éste o cambio de temperatura.

En la inducción del enquistamiento de E. invadens se tuvo éxito parcial, por lo que se requiere de más investigación para precisar las características óptimas del medio de enquistamiento para este sistema.

En general el sistema de microcultivo de Entamoeba que se desarrolló ha de facilitar el estudio de la sincronización de cultivos de este organismo así como permitirá profundizar en el conocimiento de la diferenciación de la amiba.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Arroyo-Begovich, A., Cárabez-Trejo, A. y Ruiz-Herrera, R. (1980 a). Identificación de los componentes estructurales en la pared del quiste de Entamoeba invadens. J. Parasitol. 66 (5): 735-741.
- Arroyo-Begovich, A. y Ramírez-Rojas, O. (1980 b). Origen de las paredes en forma de saco observadas en cultivos de Entamoeba invadens en proceso de enquistamiento. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11 (supl. 1) : 17-24.
- Bailey, G. R. and Renghien, S. (1980). Osmotic stress a factor controlling encystation of Entamoeba invadens. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11 (supl. 1) : 11-16.
- Balamuth, W. (1962). Effects of some environmental factor upon growth and encystation of Entamoeba invadens. J. Parasit. 48 : 101-109.
- Barker, D.C. and Swales, L.S. (1972). Characteristics of ribosomes during differentiation from trophozoite to cyst in axenic Entamoeba sp. Cell differentiation, 1: 297-306.
- Beheyt, P., Speer, C., Cawthorn, R. and Dubey, J. (1961). Le diagnostic biologique de l'amibiase hépatique aigue. Ann. Soc. Belge. Med. Trop. 41:93.
- Boeck, W.C. and Urbontav, J. (1925). The cultivation of Entamoeba histolytica. Am. J. Hyg. 5: 371-407.
- Boonlayngoor, P., Albach, R.A. and Rooden, T. (1980). Purine nucleotide synthesis in Entamoeba histolytica: a preliminary study. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11(supl. 1): 83-88.

- Brock, D. T., Brock, M. K., and Ward, M. D. (1986). Basic Microbiology with applications. Prentice Hall, Third edition. London. 587 pp.
- Chang, S.L. (1946). Studies on Entamoeba histolytica. IV. The relation of oxidation-reduction potentials to the growth, encystation and excystation of Entamoeba histolytica in culture. Parasitology, 37: 101-112.
- Chevez, A., Segura, M., Corona, D., e Iturbide, A. I. (1972). Esferulas yuxtannucleares de Entamoeba histolytica. Estudio morfológico y dinámico. Arch. Invest. Med. (Mex.) 3 (supl. 2) : 257.
- Cutler, D. W. (1916). A method for the cultivation of Entamoeba histolytica. J. Path. Bact. 23: 22-27.
- Deutsch, K. and Zeman, V. (1959). An electron microscopic study of Entamoeba invadens Rodhain 1934. Exp. Cell Res. 17: 310-319.
- Diamond, L. S. (1961). Axenic cultivation of Entamoeba histolytica. Science, 134 : 336.
- Diamond, L.S. (1968). Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 and Entamoeba histolytica-like amebae. J. Parasitol. 54: 1047-1056.
- Diamond, L.S., Harlow, D. R. and Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 431-432.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

-Gelman, O. M. and Kaciliffe, H. L. (1936). Morphology and life cycle of an amoeba producing amebiasis in reptiles. Parasitology, 28: 208-228.

-Gillin, F. D. and Diamond, L. S. (1980). Attachment and short-term maintenance of motility and viability of Entamoeba histolytica in a defined medium. J. Protozool. 27: 220-225.

-Gillin, F. D. and Diamond, L. S. (1980 a). Attachment of Entamoeba histolytica to glass in a defined maintenance medium: Specific requirements for cysteine and ascorbic acid. J. Protozool. 27: 474-478.

-Gutteridge, W. E. and Coombs, G. H. (1977). Encystation of Entamoeba invadens. In: Kamp P.D. (ed), Biochemistry of parasitic protozoa. McMillan Press, Ltd., New York, 48-54 pp.

-Hill, W. C. O. and Neal, R. A. (1954). An epizootic due to Entamoeba invadens at the garden of the zoological Society of London. Proc. Zool. Soc. Lond. 123: 731-737.

-Kudo, R. R. (1985). Protozoología, C. E. C. S. A., Edición, México, D.F., 905 pp.

-Kumate, J. (1977). Amebiasis. En: Kumate, J. y Gutiérrez, G. Manual de Infectología. Ediciones médicas del Hospital Infantil de México, México, 23-31 pp.

-Kradolfer, F. and Gross, F. (1958). Die Ingestion von Erythrozyten durch Entamoeba histolytica Schweiz. Allg. Path. and Bakterioll. 21: 1014.

-Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G. J., Honigberg, B.M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R. III, Lon, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Polkajsky, G., Sprague, V., Vavra, J. and Wallace, F. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. J. Protozool. 27 : 37-58.

-Lo, H. S. and Reeves, R. F. (1979). Riboflavin requirement for the cultivation of axenic Entamoeba histolytica Am. J. Trop. Med. Hyg. 28 : 194-197.

-Losh, F. (1875). Massenhabfte Entwicklung von Amoeben in Dickarm. Arch. Pathol. Anat. Physiol. 65: 196-211.

-McConnachie, E. W. (1955). Studies on Entamoeba invadens Rodhain 1934 in vitro and it's relationship to some other species of Entamoeba. Parasitology. 45 : 452-481.

-McConnachie, E. W. (1969). The morphology, formation and development of cysts of Entamoeba Parasitology. 59 : 41-53.

-McConnachie, E. W. (1970). Encystation in axenic cultures of Entamoeba invadens. J. Protol. 17 : (supl. ) : 25.

-McLaughlin, J. and Aley, S. 1985 Biochemistry and functional morphology of the Entamoeba. J. Protozool., 32:221.

-Meerovitch, F. (1958a). A new host of Entamoeba invadens. Rodhain 1934. Can. J. Zool., 36:423-427.

-Miller, J. H., Swartzwelder, J. C. and Deas, J. E. (1961). An electron microscopy study of Entamoeba histolytica. J. Parasitol. 47 : 577-587.

- Montalvo, F. E., Reeves, R. E. and Warren, L. G. (1971). Aerobic and anaerobic metabolism in Entamoeba histolytica. Exp. Parasitol. 30 : 249-256.
- Moss, D. M. and Visvesvera, G. 1986. Analysis of antigens from membrane and soluble fractions of Entamoeba histolytica. J. Protozool. 33: 328.
- Myer, D. F. and Morgan, R. S. (1971). Evidence for a link between division and differentiation in Entamoeba invadens. J. Protozool. 18 : 282-284.
- Neal, R. A. (1966). Experimental studies on Entamoeba with reference to speciation. Adv. Parasitol. 4 : 1-51.
- Neff, R. J., Ray, S. A., Benton, W. F. and Wilborn, M. (1964 b). Drug effects on the metabolisms of Entamoeba. In: Prescott M. D. (ed), Methods in Cell Physiology, Academic Press, New York, Vol 1, 55pp.
- Proctor, E. M. and Gregory, M. A. (1973). Ultrastructure of Entamoeba histolytica NIH 200. Int. J. Parasitol. 3 : 457.
- Ratcliffe, H. L. and Geiman, G. M. (1938). Spontaneous and experimental amebic infection in reptiles. Arch. Pathol. 25 : 160-184
- Raudin, J., Schlesinger, P., Murphy, C., Gluzman, I. and Krogstad, D. 1986. Acid intracellular vesicles and the cytolysis of mammalian target cells by Entamoeba histolytica trophozoites. J. Protozool. 33:478.
- Reeves, R. E. (1972). Carbohydrate metabolism in Entamoeba histolytica. In: Van den Bosch (ed.), Comparative Biochemistry of Parasites, Inc. New York and London. 351-355pp.

-Reeves, R. E. (1976). How useful is the energy in inorganic pyrophosphate. TIBS, March 53-55 pp.

-Reeves, R. E. and West, R. (1982). Entamoeba histolytica: nucleic acid precursor affecting axenic growth. Exp. Parasitol. 49 : 78-82.

-Rengpien, S., and Railey, G. B. (1975). Differentiation of Entamoeba: a new medium and optimal conditions for axenic encystation of Entamoeba invadens. J. Parasitol. 61:24-30.

-Richards, C. S., Goldman, M. and Cannon, L. T. (1966). Cultivation of Entamoeba histolytica-like strain at reduced temperature and behavior of the amoebae in diluted media. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15 : 648-655.

-Rodhain, J. Et Van Hoof, M. T. (1934) Note préliminaire sur le rôle pathogène possible d' Entamoeba invadens chez les serpents. C. R. Soc. Biol., Paris. 118: 1646.

-Rodhain, J. Et Van Hoof, M. T. (1936). Sur le pouvoir hématophage de Entamoeba invadens. C. R. Soc. Biol. Paris. 123:138.

-Rosenbaum, R.M. and Wittner, M. (1970). Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of Entamoeba histolytica with particular reference to helical bodies. J. Cell. Biol. 45: 367-382.

-Sirinjitakarn, A. P. and Railey, G. B. (1980). The relationship of DNA synthesis and cell cycle events to encyst to by Entamoeba invadens. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11 (supl. 1) : 3-10.

-Steck, F. (1961). Amöbendysenterie bei Reptilien. Zentbl. Bakt. Parasitkde Orig. 181: 551-553.

-Thepsparungsikul, V. S. and Bailey, G. B. (1971). Differentiation of Entamoeba: encystation of E. invadens in monoxenic and axenic cultures. J. Parasit. 57: 1285-1292.

-Tomlinson, G. and Jones, E. A. (1962). Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil amoeba. Biochem. Biophys. Acta 63: 194-200.

-Trager, W. (1963). Differentiation in protozoa. J. Protozool. 10: 1-6.

-Vanvliet, H. H. D. M., Op den Kamp, J. A. F. and VanDeenen, L. L. M. (1975). Lipid autotrophic and the effects on lipid composition of Entamoeba invadens. J. Protozool. 22: 428-432.

-Vázquez de Lara-Cisneros, I. G. and Arroyo-Regovich, A. (1984). Induction of encystation of Entamoeba invadens by removal of glucose from the medium. J. Parasitol. 70: 629-633.

-Weinbach, E. C. and Diamond, I. S. (1974). Entamoeba histolytica: aerobic metabolism. Exp. Parasitol. 35: 232-243.