

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO Y ENQUISTAMIENTO DE *Entamoeba histolytica*
POR LIOFILIZADOS DE FACTORES DIFUSIBLES DE *Lactobacillus plantarum*
Y *Bifidobacterium longum*

Barrón-González MP*, Morales-Rubio M, Morales-Vallarta M.

Departamento de Biología Celular y Genética, Cuerpo Académico de Biología Celular y Genética,
Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. México.

Tel.: 0181(8329-4110) - porfi_bagzz@yahoo.com.mx - maria.barrongn@uanl.edu.mx

RESUMEN

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amibiasis, la cual presenta dos estadios en su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste; el trofozoíto representa la fase invasiva, el quiste representa la fase infestiva y de resistencia. La droga para el tratamiento de la amibiasis es el metronidazol; sin embargo esta droga presenta múltiples efectos secundarios indeseables; por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. La Organización Mundial de la Salud ha propuesto el empleo de microorganismos para el diseño de terapias de interferencia microbiana. Entre los microorganismos recomendados se encuentran los lactobacillus y bifidobacterias.

Objetivo: Evaluar el liofilizado de factores difusibles de *Lactobacillus plantarum* (LFDLp) y de *Bifidobacterium longum* (LFDBI) sobre el crecimiento y de *E. histolytica*.

Metodología: Se evaluaron los LFDLp y LFDBI sobre el crecimiento y enquistamiento de *E. histolytica*.

Resultados: El crecimiento de *E. histolytica* es inhibido por el liofilizado de factores difusibles de *Lactobacillus plantarum* y el enquistamiento es inhibido por el liofilizado de factores difusibles de *Bifidobacterium longum*.

Conclusiones: *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* pueden ser considerados como una alternativa de prevención o tratamiento contra la amibiasis sin presentar efectos secundarios indeseables, ya que forman parte de nuestra flora intestinal.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica es uno de los protozoarios parásitos más primitivos; pertenece al orden Amoebida, de la clase Lobosea, superclase Rhizopoda subphylum Sarcodina, del phylum Sarcostigophora, (Levine, *et al.*, 1980). *E. histolytica* es un protozoario comensal que en ocasiones invade la mucosa intestinal, y puede diseminarse por vía hemática.

El cuadro clínico producido por *Entamoeba histolytica* se conoce como amibiasis o amebiasis, la cual es una enfermedad parasitaria intestinal de tipo alimenticia. De cada 10 personas a quienes les es detectado el parásito, solo una de ellas desarrollará síntomas, los cuales pueden variar desde unas pequeñas diarreas hasta casos mas graves. La amibiasis se clasifica por sus manifestaciones en sintomática y asintomática, por su localización en intestinal y extraintestinal y por su evolución en aguda y crónica, la infección asintomático es relativamente frecuente (Biagi, 1988).

De las personas que presentan la enfermedad, entre 80 a 98% manifiestan afección intestinal y los restantes afección extraintestinal. En los casos sintomáticos la intensidad es muy variable y oscila de casos leves a otros de extraordinaria gravedad; siendo común una sintomatología poco intensa, con anorexia, astenia, dolor abdominal, alteraciones en el tránsito intestinal y diarrea trivial no sanguinolenta (Pumarola, *et al.*, 1991).

La amibiasis extraintestinal puede manifestarse al cabo de varios días, meses o años del cuadro intestinal. Se ha reportado incluso en un significativo número de personas que no manifestaron síntomas previos de amibiasis intestinal (Pumarola, *et al.*, 1991).

Los cuadros clínicos de la amibiasis intestinal son: a) colonización asintomática; b) colitis amibiana aguda, es el cuadro más común, se manifiesta por dolor abdominal y evacuaciones disminuidas, acompañadas de moco y/o sangre; c) colitis fulminante, la que ocurre con mayor frecuencia en niños y que se manifiesta por dolor abdominal difuso, evacuaciones diarreicas con sangre fresca abundante y fiebre; d) ameboma, que se presenta como una masa intestinal que ocasiona dolor abdominal y que puede producir obstrucción del tránsito intestinal.

En el momento del diagnóstico del padecimiento, el cuadro suele confundirse con gran número de procesos intestinales, especialmente con la disentería bacilar (Merck Manual of Medical Information, 2004).

Para el tratamiento de este padecimiento existen drogas antiamebianas con acción a diferentes niveles de los tejidos del hospedero (Biagi, 1988). Las quinoleínas y las dihidroquinoleínas actúan a nivel luminal, la quinfolida presenta acción luminal y tisular intestinal, el metronidazol, tinidazol, zecnidazol, ornidazol, etc. presentan acción sistémica. Ninguno de los amebicidas ejerce efecto sobre los quistes. La erradicación de los quistes se logra al eliminar los trofozoítos (Romero, 1993).

Cuando se presenta un cuadro intestinal sintomático el fármaco de elección es el metronidazol. Entre los efectos colaterales de este fármaco se encuentran las náuseas, vómitos y malestar abdominal, siendo también el fármaco de elección para el tratamiento del absceso hepático amebiano. El metronidazol es parte de un listado de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer como un potencial carcinógeno humano. Aunque se ha cuestionado la metodología de algunos de los ensayos clínicos, se ha demostrado la aparición de cáncer en animales de experimentación (IARC, 1987).

Entamoeba histolytica posee dos estadios en su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste. La forma infectiva corresponde al quiste; es una estructura esférica tetranucleada formada por una cubierta de quitina que le confiere resistencia a condiciones adversas. (Ravdin, 1995).

Sin embargo, este estadio es poco estudiado debido a la incapacidad que se tenía hasta hace poco para obtenerlo bajo condiciones axénicas *in vitro* (López E. y Villagomez J., 1993).

1.2 Probióticos

De acuerdo al documento Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, emitido en el 2001 por la Organización Mundial de la Salud, la definición actual de probiótico es la siguiente: "un probiótico es todo aquel microorganismo vivo que administrado en la cantidad adecuada proporciona beneficios saludables al hospedador" (OMS 2001).

Los probióticos son alimentos que contienen microorganismos vivos cuyo consumo tiene efectos positivos para la salud por su acción sobre la flora intestinal, pues promueven el desarrollo de bacterias beneficiosas entre estas tenemos las llamadas bacterias ácido lácticas (BAL), que incluyen a *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, entre otros (Farnworth, 2001).

Una forma de actuar de los probióticos para lograr alcanzar un buen estado de salud del individuo es a través de la resistencia otorgada contra la invasión de microorganismos patógenos, que se logra mediante la generación de sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (Marteau P. and Rambaud J., 1996).

Actualmente las bacterias empleadas como probióticos pertenecen al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Una de las razones es que estos dos géneros han sido aislados del intestino del ser humano, pudiendo sobrevivir y funcionar en el mismo. Otra de las razones es que estas bacterias no presentan efectos dañinos en el hospedero, en contraste con otras bacterias intestinales.

Debido a que la amebiasis es una parasitosis con alta incidencia a nivel mundial en los países en vías de desarrollo y debido a la resistencia que presenta *Entamoeba histolytica* a los fármacos de elección y aunado a los múltiples efectos secundarios dañinos de estos en los pacientes es necesario la búsqueda de nuevos antiamebianos que afecten tanto el proceso de crecimiento como de enquistamiento de *E. histolytica*.

2. HIPÓTESIS

Es posible que el liofilizado del medio condicionado con *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* afecte el proceso de crecimiento y enquistamiento de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS bajo condiciones axénicas *in vitro*.

3. OBJETIVOS

Evaluar el efecto de los liofilizados de medios condicionados con *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* sobre el proceso de crecimiento y enquistamiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* HM1-IMSS.

4. METODOLOGÍA

4.1 Material biológico

- a) Cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica*
- b) Cultivo de *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum*
- c) Suero bovino estéril
- d) Extracto de hígado-páncreas

4.2 Medio PT.

Para el cultivo de *E. histolytica* se empleó el medio MPT, se disolvieron todos los componentes (excepto el extracto de hígado-páncreas) en 300 mL de agua bidestilada desionizada, enseguida se agregó el extracto de hígado y páncreas, se aforó a 500 mL, se ajustó a pH 7.0, empleando NaOH 10N, se procedió a su distribución en alícuotas de 10mL en tubos de borosilicato de 18x150mm con tapón de rosca y se esterilizaron a 121°C/20 min en la autoclave. Se dejarán enfriar a temperatura ambiente, enseguida se almacenarán a 4°C hasta su empleo.

4.3 Mantenimiento de *Entamoeba histolytica* HMI-IMSS.

Cuando las células se encontraron en la mitad de su fase logarítmica de crecimiento se hicieron resiembras sucesivas de 2×10^4 trofozoítos /mL en medio PT, agregando a cada tubo de 18x150mm de tapón de rosca 0.1 mL de la solución de penicilina- estreptomycina y 1.0 mL de suero bovino. La cepa fue incubada a 37°C por 72 h. Previo a cada resiembra los cultivos se observaron en un microscopio invertido para comprobar el buen estado de las células. El cultivo contenido en los tubos de 18x150 se colocó en agua-hielo a temperatura de congelación por 20 min, con la finalidad de despegar las células adheridas al tubo. El número de células/mL se determinó tomando un alícuota del cultivo y determinando el número de trofozoítos presentes con la ayuda de una cámara de Neubauer.

4.4 Cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica*.

Se enfrió el tubo fuente de inóculo en agua-hielo durante 20 min, se inocularon 1×10^4 trofozoítos/mL de *E. histolytica* en 18 tubos de 13x150mm los cuales contenían 5 mL del medio MPT, 0.5 mL de suero bovino, 0.05 mL de solución penicilina-estreptomycina; se incubaron a 37°C durante 5 días y cada 24 h se determinará por triplicado el número de trofozoítos/mL empleando una cámara de Neubauer. Después se realizará una grafica con los datos obtenidos para obtener la cinética de crecimiento de *E. histolytica*.

4.5 Mantenimiento de las cepas de *L. plantarum* y *B. longum*.

A partir de la cada cepa de probiótico las cuales se mantuvieron en refrigeración a 4°C en el medio MPT, se tomó una asada y se sembró en el medio para el cultivo de probióticos, el cual se incubó a 37°C por 48 h.

4.6 Obtención del medio condicionado de *L. plantarum* y *B. longum*.

A partir de la cepa reactivada previamente de *L. plantarum* y *B. longum* se tomó una asada y se agregó un inóculo al 10% en 1 L de medio MPT-caldo para el cultivo de probióticos, se incubó a 37°C/48 h, después se centrifugó 3 veces a 1,500 rpm/5 min, enseguida se separó el precipitado del sobrenadante, se esterilizó por filtración utilizando filtros millipore de 0.22 µm. Posterior a éste se le realizó una prueba de esterilidad, tomando un alícuota y colocándolo en MPT-caldo, incubándolo a 37°C/24h, cuando la prueba resultó positiva en esterilidad el sobrenadante obtenido se empleó como medio condicionado de *L. plantarum* o *B. longum*.

4.7 Obtención del liofilizado de medio condicionado con *L. plantarum* o *B. longum*.

El sobrenadante del cultivo de cada bacteria en el medio MPT previamente obtenido se congeló a -20°C durante 48 h y enseguida se procedió a liofilizarlo, el liofilizado obtenido se mantuvo en un frasco de vidrio estéril almacenado dentro de las instalaciones del laboratorio.

4.8 Preparación de la solución concentrada del LMCLp o LMCBI.

Se prepararon las soluciones concentradas a partir de cada liofilizado de medio condicionado con *L. plantarum* o *B. longum*. La solución concentrada contiene 45 mL de agua desionizada pH 7.0 y 2.916 g del cada liofilizado, después la solución fue filtrada con la ayuda de filtros millipore de 0.22 µm y sometida a prueba de esterilidad. Una vez que la prueba de esterilidad resultó positiva la solución concentrada fue almacenada a -20°C hasta su uso.

4.9 Bioensayos

a) Evaluación del LMCLp y LMCBI sobre el crecimiento de *E. histolytica*.

Se inocularon 24 tubos conteniendo 5 mL del medio de cultivo MPT de cada uno de los liofilizados de factores difusibles a evaluar (1, 10, 20, 50 o 100 mg/mL) proveniente de cada una de las BAL, se adicionó con, 0.05 mL de solución de penicilina-estreptomicina y 0.5 mL de suero bovino y un inóculo de 1×10^4 células/mL, se incubaron a 37°C por 72 horas, posteriormente de cada LMC se determinó la densidad celular de tres tubos de cultivo.

b) Evaluación del LMCLI sobre el enquistamiento de *E. histolytica*

Para inducir el enquistamiento de *E. histolytica* se empleó el método modificado de alta tensión de CO₂, el cual consta de dos fases. En la primera fase (fase de crecimiento) se incubaron 2×10^4 células en tubos de 18x150 conteniendo 10 mL de medio MPT, se gasearon los tubos hasta saturación con CO₂, introduciendo hasta el fondo del tubo una pipeta Pasteur con filtro de algodón, la cual se encontraba conectada a un tanque conteniendo CO₂ de 99.9% de pureza, posteriormente se incubaron a 37°C por 72 h. Transcurrido este periodo se enfriaron los tubos en el congelador en agua-hielo por 20 min, enseguida se vertió el contenido de tres tubos en un tubo cónico de 50 mL, enseguida se centrifugó el contenido de los tubos con las células y se eliminó el sobrenadante, reservando el paquete celular. En la segunda fase (fase de enquistamiento) el paquete celular proveniente de ocho tubos de cultivo se inoculó en los matraces conteniendo 35 mL del medio de enquistamiento, donde el medio no contiene glucosa y el liofilizado del medio condicionado con *L. lactis* (LMCLI) en la concentración a evaluar (10mg/mL y 20 mg/mL), se gasearon los matraces hasta saturación con CO₂, introduciendo hasta el fondo del matraz una pipeta Pasteur con filtro de algodón, la cual estaba conectada a un tanque conteniendo CO₂ de 99.9% de pureza, posteriormente se incubaron a 37°C por 4 días. Cada ensayo se realizará en tres veces por triplicado. Nuestro control consistió en el mismo procedimiento aquí descrito exceptuando la adición del liofilizado del medio condicionado.

4.10 Determinación del rendimiento porcentual de estructuras quísticas de *E. histolytica* en base a su resistencia al detergente sarcosyl 0.1%.

En cada uno de los ensayos se determinó el porcentaje de rendimiento de las formas quísticas de *E. histolytica* empleando conteos previos y posteriores a la aplicación del detergente sarcosyl 0.1% por 10 min.

c) Análisis estadístico.

Para determinar el efecto de los liofilizados de los medios condicionados con probióticos (Bacterias ácido-lácticas) en el crecimiento y enquistamiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* se realizaron tres eventos independientes por triplicado. Se promediaron los rendimientos obtenidos en los diferentes experimentos y se compararon contra el cultivo control mediante análisis de varianza con una $P(<0.05)$ empleando la prueba de Dunnet-t (2-side) con el paquete estadístico SPSS.

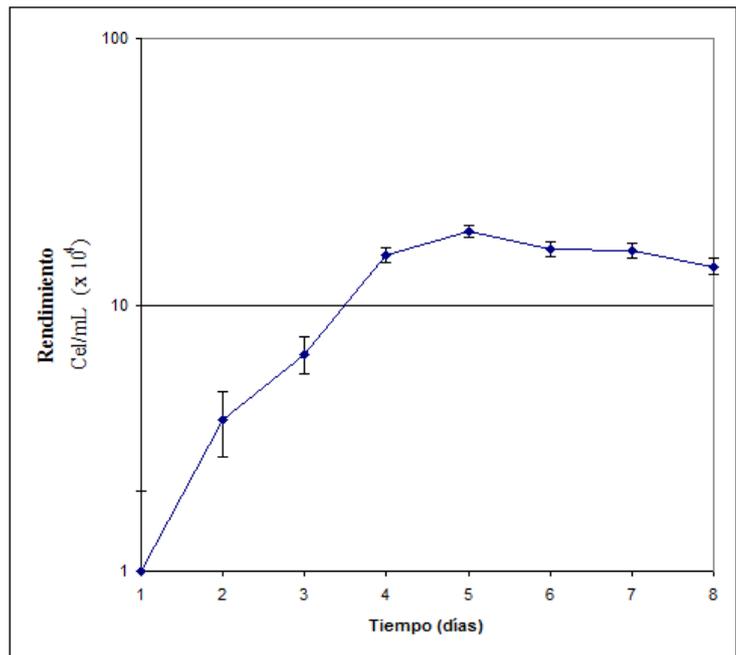
5. RESULTADOS

5.1. Cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica* HMI-IMSS.

Cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. En la cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS, no se observa fase de adaptación, lo cual indica el buen estado fisiológico de las células, se observa una fase de crecimiento logarítmico desde su inicio, alcanzando un rendimiento máximo de 187,291 cel/mL al día cuatro. Posteriormente se observa un moderado descenso

en el rendimiento en el número de células. Esta cinética es el resultado de tres eventos independientes por triplicado (ver Fig. 1).

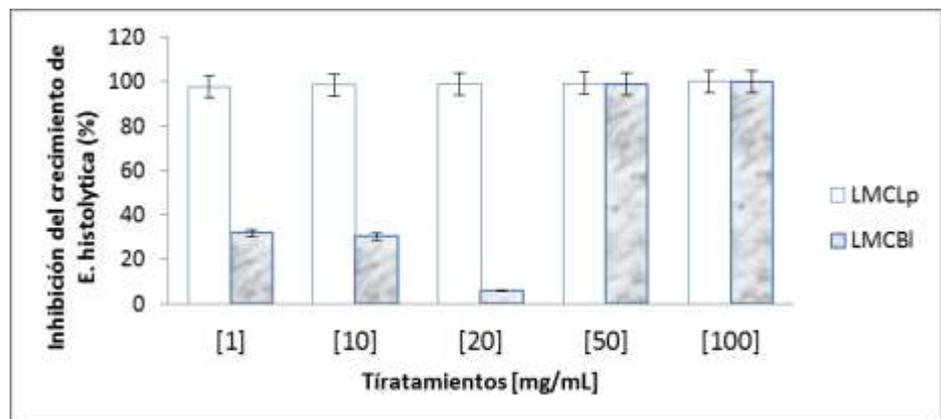
Fig. 1.
Cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica* HMI-IMSS.
 Gráfica donde se muestra la curva de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS



5.2 Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*.

El efecto de liofilizados de medio condicionado con *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS se observan en la Tabla I, en el cual se muestran los rendimientos celulares obtenidos a las 72 horas de incubación en el medio de crecimiento MPT adicionado con 1, 10, 20, 50 ó 100 mg/mL de los liofilizados de medio condicionado con *L. plantarum* (LMCLp) o *Bifidobacterium longum* (LMCBI).

Fig 2.
 Comparación porcentual de la inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* por acción del LMCLp y LMCBI



Estos valores muestran que el liofilizado del medio condicionado con *Lactobacillus plantarum* inhibe significativamente a partir de la concentración de 1 mg/mL, no presentando diferencia significativa con relación a las 5 concentraciones evaluadas sobre el proceso de crecimiento de *E. histolytica*. El liofilizado del medio condicionado con *Bifidobacterium longum* presenta inhibición del crecimiento hasta la concentración de 50 mg/mL, no presentando diferencia significativa con respecto a la concentración de 100 mg/mL, siendo este último liofilizado (LMCBI) el que presenta menor actividad inhibitoria del crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*.

5.3 Determinación del porcentaje de inhibición del enquistamiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* en presencia de liofilizados de medios condicionados con *Lactobacillus plantarum* o *Bifidobacterium longum*.

En la figura 3 se observa el porcentaje de inhibición del enquistamiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS en presencia de 1, 10, 20 y 50 mg/mL del liofilizado medios condicionados con las bacterias probióticas *Lacto-bacillus plantarum* y 50 mg/mL del LMC con *Bifidobacterium longum*.

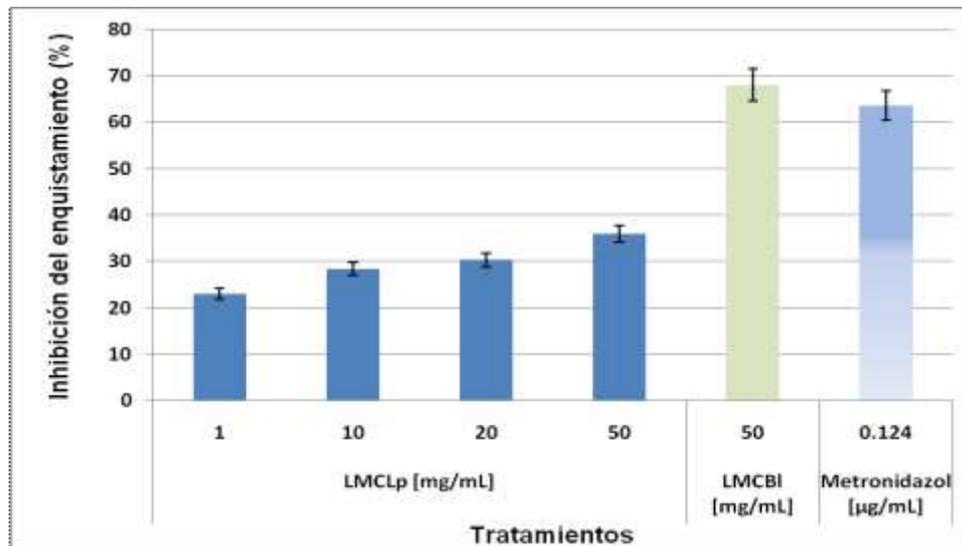


Fig. 3. Comparación porcentual de la actividad inhibitoria del enquistamiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* en presencia de liofilizados de medio condicionado con *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum*.

En estos resultados se observa la capacidad del liofilizado del medio condicionado con *Bifidobacterium longum* el cual presenta el mayor porcentaje de inhibición del proceso de enquistamiento de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS bajo condiciones axénicas *in vitro* a la concentración de 50 mg/mL.

Los resultados indican que el enquistamiento se ve afectado principalmente por la concentración de 50 mg/mL del LMCBI inhibiendo el enquistamiento en un 68%, este porcentaje de inhibición es superior a la inhibición que presenta el control positivo, el metronidazol a la CI₅₀ [0.124 µg/mL], el cual presentó un porcentaje de inhibición del 63.54. De los bioensayos realizados con 50 mg/mL, el LMC menos eficiente como inhibidor del enquistamiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* es el LMCLp ya que sólo presentó un 35.89 % de inhibición del enquistamiento.

6. DISCUSIÓN

En la actualidad la amibiasis es un problema de salud pública que se combate con el uso de fármacos que presentan múltiples efectos secundarios para el paciente, lo cual ha llevado a la realización de investigaciones sobre nuevas formas de tratar este padecimiento. El estadio de quiste es el responsable de la diseminación y de la transmisión de la amibiasis, y el trofozoíto es el responsable de la invasión a órganos, por lo cual este trabajo se centró en evaluar el efecto que poseen los liofilizados de medios condicionados con *L. plantarum* y *B. longum* sobre el proceso de crecimiento y enquistamiento de *Entamoeba histolytica*, pudiendo reducir así la diseminación de este padecimiento (Samarawickream, et al., 1997).

El efecto inhibitorio que se observó tanto en el crecimiento como en el enquistamiento de *E. histolytica* en presencia de liofilizados de medios condicionados con *L. plantarum* y *B. longum* bajo condiciones axénicas *in vitro* puede ser atribuido a la presencia en el medio de cultivo de algún o algunos de los metabolitos secundarios de las bacterias acidolácticas o debido a la sinergia de estos metabolitos. (Pérez et al, 2001).

La ausencia de antecedentes acerca del efecto de los tres probióticos aquí ensayados, sobre el crecimiento y del enquistamiento de *E. histolytica*, destaca la importancia de este trabajo, ya que los efectos colaterales indeseables de las drogas antiamebianas usualmente empleadas podrían ser evitados a tra-

vés del consumo de los productos activos de las BAL aquí probadas, además recientes investigaciones reportan la resistencia *in vitro* de *E. histolytica* a la droga antimibiana de elección: el metronidazol (Samarawickream, *et al.*, 1997), por lo cual resulta muy conveniente contar con alternativas sin efectos secundarios indeseables para el tratamiento de la amibiasis.

Los presentes resultados abren así la posibilidad de contar con una alternativa nutricional al alcance de la mayoría de la población, para la prevención y/o el tratamiento de la amibiasis sin presentar efectos secundarios indeseables.

Actualmente para el tratamiento de la amibiasis existen solamente fármacos de acción sistémica y de acción luminal, sin embargo se ha demostrado en estudios como el de Samarawickream, *et al.*, 1997 que existen cepas de *E. histolytica* que son resistentes a los fármacos de elección, los cuales actúan sobre el estadio de trofozoíto y no tienen ninguna acción sobre los quistes, además de que estos fármacos presentan múltiples efectos secundarios para el ser humano.

Los resultados aquí obtenidos muestran una clara tendencia a la inhibición tanto del crecimiento, como del proceso de enquistamiento de *E. histolytica* HM1-IMSS por la acción del liofilizado de medio condicionado con *L. plantarum* y de *Bifidobacterium longum* respectivamente.

Ya que se sabe que ciertas bacteriocinas peptídicas son consideradas como péptidos formadores de complejos de poración, los cuales presentan una diferente selectividad iónica, se podría suponer que la inhibición del proceso de enquistamiento de *E. histolytica* se vio afectado por la inhibición de la formación de quitina al afectar el proceso de formación de este polímero, ya que en este proceso están implicados los iones Co^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} como cofactores de la enzima quitina-sintasa (Campos, *et al.*, 1996) por lo que una vez alterada la cantidad de estos iones en *E. histolytica*, el proceso mediante el cual se forma la pared de quitina del quiste se ve alterada, lo cual impide la diferenciación de trofozoíto a quiste, imposibilitando así la formación de las estructuras encargadas de la diseminación de la amibiasis.

En base a estos resultados, evidenciamos la capacidad de *L. plantarum* y *B. longum* como microorganismos benéficos para combatir al parásito intestinal *E. histolytica*, ya que inhiben tanto el proceso de crecimiento como de enquistamiento bajo condiciones axénicas *in vitro*, pudiendo ser una terapia complementaria ya sea preventiva o terapéutica contra la amibiasis.

Los resultados de este trabajo se suman a los esfuerzos por contribuir a la búsqueda de nuevas terapias de interferencia microbiana, tal como lo recomienda la OMS. los cuales, por formar parte de la flora indígena del ser humano a nivel de colon distal, es muy probable que no presenten efectos secundarios indeseables en el mismo.

Consideramos que en un futuro es necesario continuar con las investigaciones sobre esta bacteria y sus sustancias activas, dilucidando así su utilidad, mecanismo de acción y la determinación de la o las sustancias presentes en el LMCLI que poseen la acción inhibitoria sobre el proceso de crecimiento y enquistamiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* HM1-IMSS.

7. CONCLUSIÓN

El crecimiento de *E. histolytica* es inhibido por el liofilizado de factores difusibles de *Lactobacillus plantarum* y el enquistamiento es inhibido por el liofilizado de factores difusibles de *Bifidobacterium longum*.

LITERATURA CITADA

- Barrón-González M.P., Villareal-Treviño L., Verduzco-Martínez J.A., Mata Cárdenas B.D., Morales-Vallarta M.R., 2008. *Entamoeba histolytica*: cyst-like structures *in vitro* induction. *Experimental Parasitology*, **118**:600-603.
- Biagi T., Reed S., Wirth D., 1988. DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**:671-676.
- Boeck W.C. and Drbohlav J., 1925. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Hygiene*, **5**:371-407.
- Campos Góngora E., 1996. Incremento de la síntesis de quitina en quistes de *Entamoeba histolytica* por efecto de Mg^{+2} , Mn^{+2} y Co^{+2} . Tesis inédita, FCB, UANL.
- Casas-Castellanos E., Barrón-González, M.P., Villareal Treviño L., Verduzco-Martínez J.A., Mata Cárdenas B.D. y Morales-Vallarta M.R., 2008. Efecto de medios condicionados con probióticos en el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*.

III CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE CAMBIO CLIMATICO Y DESARROLLO SUSTENTABLE

- Chinn B., Jacobs L., Reardon L., Rees C., 1942. The influence of the bacterial flora on the cultivation of *Entamoeba histolytica*. American Journal of Tropical Medicine, **22**:137-146.
- Cohen J., 1995. A stubborn amoeba takes center stage. Science, **267**: 822-824.
- De Ross N.M., Katan M.B. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. American Journal of Clinical Nutrition, **71**, 405-411, 2000.
- Diamond L.S., 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science, **134**:336-337.
- Diamond L.S., 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoeba. Journal of Parasitology, **54**:1047-1056.
- Farnworth E. R., 2001. Probiotics and prebiotics. In: Handbook of Nutraceutical and Functional Foods, **25**:407-422.
- Fuller R., 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, **66**:365-378.
- Grahn E., 1994. Interference of a *Lactococcus lactis* strain on the human gut flora and its capacity to pass the stomach and intestine. Scandinavian Journal Nutrition, **38**:2-4.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1987. Metronidazol: Summaries and Evaluation, Supplement 7.
- Kimoto H., 2000. In vitro studies on probiotic properties of lactococci. Milchwissenschaft, **55**: 245-249.
- Levine N.D., [Corliss J.O.](#), Cox F.E., [Deroux G.](#), [Grain J.](#), [Honigberg B.M.](#), [Leedale G.F.](#), [Loeblich A.R. 3rd](#), [Lom J.](#), [Lynn D.](#), [Merinfeld E.G.](#), [Page F.C.](#), [Poljansky G.](#), [Sprague V.](#), [Vavra J.](#), [Wallace F.G.](#), 1980. A newly revised classification of the Protozoa. Journal of Protozoology, **27**:37-58.
- Macfarlane G.T., Gibson G.R. In: Human Health. The contribution of microorganisms (Gibson SAW, ed), pp. 17-52. Springer-Verlag, London UK.
- Merck Manual of Medical Information. 2004. Second Home Edition Online Version. http://www.merck.com/mrkshared/mmanual_home2/sec17/ch196/ch196.jsp
- Martínez-Palomo A., 1987. The pathogenesis of amoebiasis. Parasitology Today **3**(4):111-118.
- Mata Cárdenas, B.D., Morales Vallarta M.R., Vargas Villareal J., Saíd Fernández S., 1996. PACSR: A serum replacement for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* in a serum-free media. Archive of Medical Research, **28**:106-107.
- OMS, 2001. Guidelines for the evaluation of probiotics in food.
- Parvez S., Malik K.A., Ah Kang S., Kim H.Y., 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Journal of Applied Microbiology, **100**:1171-1185.
- Perdigon G., Alvarez S., Nader de Macias, M.E., 1990. The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. Journal of Food Protection, **53**:404-410.
- Ravdin, J. I., 1995. State of the art clinical article. Clinical Infectious Disease, **20**:1453-1466.
- Rolfe R.D., 2000. The role of probiotics cultures in the control of gastrointestinal health. Journal of Nutrition, **130**:396S-402S.
- Salminen S., Wright A., Ouwehand A., 2004. Lactic Acid Bacteria, 3rd edition; pp 250-532.
- Samarawickream N.A., Brown D.M., Upcroft J.A., Thammapalerd N., Upcroft P., 1997. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanism of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. Journal of antimicrobial chemotherapy, **40**:833-40.
- Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Balz R., Collins M.D., Fischer W., 1985. "Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov". Systematic Applied Microbiology, **6**:183-195.
- Sepúlveda B. 1982. Amebiasis host-pathogen biology. Review of Infectious Diseases, **4**: 836-842.
- Sepúlveda B. and Martínez-Palomo A. 1984. Amebiasis. En: Tropical and geographical medicine. Warren, K. S. and Mahmoud, A. A. S., eds. McGraw-Hill, New York. pp 305-318.
- Sepúlveda B., Jinich H., Bassols F. y Muñoz, R. K. 1954. La amebiasis del hígado. Su diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Revista de Investigación Clínica, **6**:165-187.
- Somers E.B. and Taylor S.L., 1987. Antibotulinal effectiveness of nisin in pasteurized process cheese spreads. Journal of Food Protection. **50**:2326-2328.
- Walsh J.A. 1986. Amebiasis in the world. Archivos de Investigación Médica. México, **17**(S1):385-389.
- World Health Organization. 1969. Amoebiasis. Geneva report of a W.H.O. Expert Committee. W.H.O. Technical Report Series, No. 421.