

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INDUCCION DE CUERPOS CROMATOIDES EN TROFOZOITOS QUE
CRECEN EN FASE-LOG Y DIFERENCIACION DE Entamoeba invadens
POR ALTA TENSION DE CO₂. ASPECTOS EN LA FORMACION
DE LA PARED DEL QUISTE

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

BIOL. MARIO RODOLFO MORALES VALLARTA

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1991

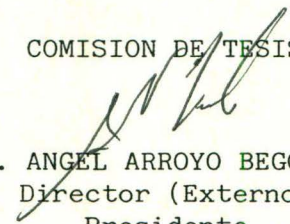
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

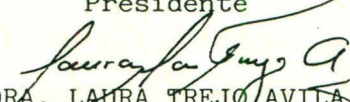
INDUCCION DE CUERPOS CROMATOIDES EN TROFOZOITOS QUE CRECEN EN FASE-LOG
Y DIFERENCIACION DE *Entamoeba invadens* POR ALTA TENSION DE CO₂ . ASPECTOS
EN LA FORMACION DE LA PARED DEL QUISTE

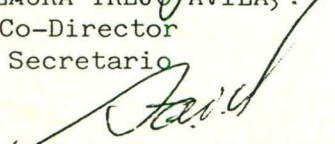
T E S I S
QUE EN OPCION AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS


P R E S E N T A
BIOL. MARIO RODOLFO MORALES VALLARTA

COMISION DE TESIS


DR. ANGEL ARROYO BEGOVICH
Director (Externo)
Presidente


DRA. LAURA TREJO AVILA
Co-Director
Secretario


DR. SALVADOR SAID FERNANDEZ
Asesor
Vocal


DR. RAUL GARZA CHAPA
Asesor
Vocal

"Lo que la escultura hace al mármol,
la educación hace al alma".-

Addison

A LA PERSONALIDAD MAS SUBLIME
EN LA HISTORIA DE LA HUMANIDAD

JESUS DE NAZARET

(El Hijo de Dios)

y a su Madre

MARIA

Porque no hay nada oculto que no haya de manifestarse,
ni secreto que no haya de saberse.

Mt. 10, 26

A mi esposa

Norma Alicia

A mis hijos

Norma Elisa

Mario Arturo

Salvador Fernando y

Nora Deneb

Quienes pacientemente han sabido ayunar, por un buen tiempo, de las alegrías de los paseos familiares.

Fueron ellos la inspiración para iniciar y culminar este trabajo.

A mi madre

Sra. Carmen Vallarta de Morales

Que fué ternura cuando niño,
soporte cuando joven,
y amor toda la vida.

A la memoria de mi padre

Sr. Raúl Morales Ramírez

Cuya vida sencilla, dedicada al trabajo y a la familia nos mostró el ejemplo de una vida honrada.

Al Maestro **Biól. Carlos H. Briseño de la Fuente**
Una vida profesional dedicada a la enseñanza universitaria.

Al Dr. Mario Castañeda Morales

En cuyo laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. me inicié en los aspectos de la investigación científica, y a mis compañeros y amigos que formamos aquel grupo de trabajo, **Ricardo Santiago, Rocío y Rosalva.**

A mis hermanos **Raúl Antonio y Magdalena Friné, María del Pilar y Eduardo, Salvador y Teresa.**

A la **Sra. Elisa Ríos de Suárez y José León Suárez Leal** padres de mi esposa. A mis cuñados -- **Ezequiel y Vicky, José León y Eva, Luis Fernando**

y Ana Cristina, a Hugo Alberto y Olga.

A mis sobrinos Mónica Friné, Alicia Margarita,
Carmen Patricia, Raúl, Ana Carmen, "Teresita"
Ezequiel, Luis Alberto, Omar, Damaris, Eunice
y Saralí.

Porque el amor no se divide, se multiplica.

I N D I C E

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
AGRADECIMIENTOS	xiv
RESUMEN	xvi
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
MATERIALES	12
Origen de los reactivos	12
Material biológico	12
Medio de cultivo TP-S-1	13
Medio axénico de enquistamiento (AEM)	14
Preparación de la solución salina de fosfatos (PBS)	14
Preparación de la solución de penicilina-estreptomina.	15
Preparación de hidróxido de sodio 10 N.	15
Obtención y almacenamiento de agua tridestilada y esterilizada.	15
Preparación de: Glutaraldehído al 2%	15
Resina epoxi medcast	16
Acetato de uranilo	16
Citrato de plomo	16
Azul de toluidina	16
Buffer de fosfato 0.2 M, pH 7.2	16
Calcofluor M2R 1%	16
Tritón X-100 al 1%	16

METODOLOGIA	17
Mantenimiento de la cepa	17
Cinética de Crecimiento Normal	17
Determinación de la densidad celular	17
Inducción del enquistamiento en medio axénico de enquistamiento (AEM).	17
Cinética de crecimiento con alta tensión de CO ₂ .	17
Gaseo de los tubos con CO ₂ (alta tensión de CO ₂)	17
Crecimiento de trofozoítos con alta tensión de CO ₂ para observación en microscopía.	18
Inducción del enquistamiento con alta tensión de CO ₂ y ayuno de glucosa.	18
Observación con microscopía de fluorescencia	18
Aparato utilizado para gasear los cultivos con CO ₂ (Fig. 1)	19
Microscopía electrónica de barrido	20
Microscopía electrónica de transmisión	20
Prueba de viabilidad de quistes	20
RESULTADOS	21
A. Inducción de la formación de cuerpos cromatoides en trofozoítos de <i>E. invadens</i> por alta tensión de CO ₂ .	21
Efecto del CO ₂ sobre el crecimiento de <i>E. invadens</i>	21
Inducción de cuerpos cromatoides y cambios en la ultraestructura de trofozoítos de <i>E. invadens</i> por alta tensión de CO ₂	21
Resumen de las observaciones al microscopio electrónico en relación a la inducción de cuerpos cromatoides por acción del CO ₂ en <i>E. invadens</i>	29

B. Diferenciación de <i>E. invadens</i> por alta tensión de CO ₂ en combinación con ayuno de glucosa.	30
Inducción del enquistamiento	30
Caracterización del quiste	30
Efecto del CO ₂ de alta pureza	35
Variación en el potencial de Oxido-Reducción	35
Diferencias en la osmolaridad	36
Variantes en el medio de enquistamiento	36
Estructura del quiste	41
Estructura del quiste	41
C. Morfogénesis de la pared celular del quiste de <i>E. invadens</i>	44
Evolución de las células en AEM	44
Respuesta al fijador de células con pocas horas en AEM	44
El enquistamiento es asincrónico	44
Secuencia de cambios morfológicos en la superficie celular que conducen a la formación de la pared del quiste (AEM)	46
Agrupamiento entre quistes	46
Presencia de depresiones en la pared celular	49
Evidencia de una película primordial que rodea a la célula.	49
DISCUSION	51
CONCLUSIONES	65
PERSPECTIVAS	66
REFERENCIAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

mOs	Miliosmoles
u	Micras
ml	Mililitros
mm	Milímetro
l	Litros
h	Horas
N	Concentración Normal
g	Gramos
min	Minutos
°C	Grados centígrados
X	Concentración con respecto a la solución de trabajo
pH	Potencial hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
%	Por ciento
° A	Amstrong
lb	Libras
Pulg ²	Pulgadas cuadradas
DDSA	Dodecenil succínico anhidro
NMA	Metil nádico anhidro
DMP	2-4-6 tridimetilamino metil fenol
Fig (s)	Figura, figuras
Kv	Kilovatios
log	Logaritmo
Kg	Kilogramos
d	días
nm	Nanómetros

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Fig.	Pág.
1 Aparato utilizado para gasear los cultivos con CO ₂ .	19
2 Cinéticas de crecimiento de Entamoeba invadens IP-1 en medio TP-S-1 normal y con alta tensión de CO ₂ .	22
3, 4 y 5 Micrografías electrónicas de trofozoítos de E. invadens crecido por 24 h con alta tensión de CO ₂ .	22-23
6 Micrografía electrónica de un trofozoíto de E. invadens crecido por 24 h con tensión normal de CO ₂ .	26
7, 8 y 9 Micrografía electrónica de trofozoítos de E. invadens crecidos por 48 h con alta tensión de CO ₂ .	26-27
10 Corte semifino de trofozoítos de E. invadens crecidos por 72 h con alta tensión de CO ₂ .	28
11 Micrografía electrónica de un trofozoíto de E. invadens crecido por 96 h (4 días) con alta tensión de CO ₂ .	28
12 Corte semifino de trofozoítos de E. invadens crecidos por 120 h (5 días) con alta tensión de CO ₂ .	28
13 Resumen de las observaciones al microscopio electrónico en relación a la inducción de cuerpos cromatoides por acción del CO ₂ - en E. invadens .	29
14-A Quistes de E. invadens obtenidos por alta tensión de CO ₂ y ayu <u>n</u> o de glucosa y observados por microscopía de contraste de fase.	31
14-B Micrografía del mismo grupo de células de la figura 14-A, pero tratados previamente con calcofluor M2R y observadas por microscopía de fluorescencia.	31
15-A Fracción de una pastilla de células observadas por microscopía electrónica de transmición, después de 96 h en medio de enquistamiento con alta tensión de CO ₂ .	32
15-B Fracción de la misma pastilla de la figura 15-A, la cual fué - previamente tratada con tritón X-100 0.1% por 20 min.	32

- 16-A y 16-B Muestras de quistes obtenidos con alta tensión de CO₂ y con medio AEM (16-B). 33
- 17 Micrografía electrónica de una pastilla de quistes de *E. invadens* obtenida con alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa. 34
- 18 Quiste de *E. invadens* inducido por alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa y observado por microscopía electrónica de barrido. 34
- 19 Agregado de quistes de *E. invadens* obtenidos por alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa y observado por microscopía de barrido. 42
- 20 y 21 Cortes semifinos de quistes de *E. invadens* obtenidos por -- alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa. 42-43
- 22 Trofozoítos de *E. invadens* fijados con glutaraldehído y observados con microscopía de barrido dos horas después de haber sido -- colocados en AEM. 45
- 23 Trofozoítos de *E. invadens* con 60 h en la segunda fase del método de enquistamiento con alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa observados con microscopía de barrido. 45
- 24 Trofozoítos de *E. invadens* con aproximadamente 16 h en AEM observados por microscopía de barrido. 47
- 25 Trofozoíto de *E. invadens* en medio de crecimiento observado por -- microscopía de barrido. 47
- 26 Trofozoítos de *E. invadens* en medio AEM observados con microscopía de barrido. 47
- 27 Trofozoíto en estado avanzado de diferenciación observado por microscopía de barrido. 47
- 28 Quistes de *E. invadens* formados en AEM, observados por Microscopía de barrido. 47
- 29 Agregado de quistes de *E. invadens* formado en AEM y observado por -- microscopía de barrido. 47
- 30 y 31 Formas quísticas observadas por microscopía de barrido donde se pueden observar las depresiones o cavidades (flecha) en la pared de quistes de *E. invadens* formados en AEM. 50

32	Micrografía de barrido donde se muestra la presencia de trofozoítos con 30 horas en AEM que muestra la presencia de una película que rodea a la célula.	50
33	Diferenciación en <i>E. invadens</i> .	60-61
34	(A-D). Trofozoítos en fase de enquistamiento que muestran secreción a través de vesículas.	61
35	Modelo de la posible secuencia de eventos que ocurren durante la formación de la pared celular del quiste.	63
	Cuadro I Variantes en el método de enquistamiento.	39

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo pudo ser realizado gracias a un gran número de personas a quienes hago patente mi más sincero agradecimiento. El apoyo recibido por ellas así como de las instituciones en las que laboran ha sido -- fundamental para poder llevar a cabo el presente trabajo.

Mi más sincero agradecimiento:

Al **Dr. Angel Arroyo Begovich**, por su amable confianza al aceptar ser el Director del presente trabajo y presidente de la comisión de tesis. Sus -- acertadas observaciones han permitido una mejor calidad de este trabajo. -- A la **Dra. Laura Trejo Avila**. por su confianza al aceptar ser co-director interno y por su desinteresada y continúa motivación para terminar esta -- tesis. Al **Dr. Salvador Said Fernández** por su desinteresada ayuda al permiti -- tir su laboratorio para diversas mediciones y por invaluable ayuda como ase -- sor. Al **Dr. Raúl Garza Chapa**, miembro también de la comisión de tesis, de -- quién desde mi época de estudiante de licenciatura he recibido un gran apo -- yo, esencialmente, en el aspecto académico.

Asímismo, al **Q.F.B. Enrique Ramírez Bon**, el **Q.B.P. José Ruíz Ordoñez** y -- el **Biól. M.C. Carlos Leal Garza**, cuya amistad y desinteresada ayuda me per -- mitieron, respectivamente, la obtención de los cortes finos, semifinos y -- fotografías al microscopio electrónico de transmisión; de las fotografías al microscopio electrónico de barrido; y de las fotografías de cortes semi -- finos y microscopía de fluorescencia. Al **Dr. José Antonio Luna de la Rosa**, por su inapreciable ayuda y excelente trabajo de fotografía. Al **Dr. Reyes S. Tamez Guerra** por su amabilidad al permitirnos el uso de equipo diverso en su laboratorio. A la **Srita. Irma Portillo Rodríguez** quién amable y pa -- cientemente escribió los borradores y el trabajo final. Al **Biól. Jorge A. Verduzco Martínez** por su continúa ayuda en el laboratorio y su siempre -- -- pronta disponibilidad. A "mis" extesistas, **Q.B.P. María del Pilar Carranza Rosales**, **Q.B.P. Mónica C. Ramos Guerra** y **M.C. Licet Villarreal Treviño**. Su trabajo en el laboratorio fué fundamental para el desarrollo de esta in -- vestigación.

Al **CIBMYC** (Centro Internacional de Biología Molecular y Celular), por la ayuda aportada para el desarrollo de la parte correspondiente a la Inducción de Cuerpos Cromatoides (Proyecto CIBMYC 0390), Al **CONACYT** por la ayuda aportada para el desarrollo de la parte correspondiente a los Aspectos de la formación de la Pared del Quiste (Proyecto PCSABNA-021534). A las Unidades de Microscopía Electrónica de la **Facultad de Medicina y Ciencias Biológicas** y al **Laboratorio de Inmunología** de esta última facultad, - todas ellas de la **U.A.N.L. A Vitro. Tec** por permitirnos amablemente el -- uso del microscopio electrónico de barrido. A la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste (**UNIBIN**) del **I.M.S.S.** por permitirnos amablemente el uso de equipo diverso.

A todos aquellos que, aunque no mencionados aquí, de alguna manera participaron en el desarrollo de este trabajo. A todos ellos mi más sincero agradecimiento.

R E S U M E N

Basados en los antecedentes en relación al efecto del CO_2 , O_2 y potencial redox en el crecimiento de amibas del género **Entamoeba** y al hecho de que los cambios en la fisiología celular muchas veces van acompañados de cambios en la ultraestructura, se postuló la posibilidad de la existencia de cambios en la ultraestructura de trofozoítos que crecen con alta tensión de CO_2 . Los resultados obtenidos al tratar de probar esta hipótesis mostraron, durante el desarrollo de una cinética normal, la presencia de notables cambios en la organización de la cromatina al primer día de cultivo, al segundo día la presencia de hélices semejantes a las que forman los cuerpos cromatoides (hélices ribonucleoprotéicas) y desde el tercero al décimo día los cuerpos cromatoides fueron evidentes y numerosos, además de que el crecimiento del cultivo fué semejante al testigo.

Siendo los cuerpos cromatoides invariablemente presentes en prequistes y quistes de **Entamoeba**, la presencia de estas estructuras en trofozoítos - crecidos activamente con alta tensión de CO_2 , así como el hecho de que en los medios de enquistamiento la ausencia de glucosa es un requisito común, se vió la posibilidad de que trofozoítos que han crecido previamente con alta tensión de CO_2 , si se colocan en un medio sin glucosa y alta tensión de CO_2 , producirán quistes maduros. Ensayos de tales condiciones mostraron la inducción de formas quísticas cuya caracterización demostró que fueron quistes maduros y viables.

Por otra parte, el análisis de la morfogénesis de la pared del quiste - mediante microscopía electrónica de barrido mostró que la formación de la pared se inicia aparentemente con la formación de una delgada película la cual, al reducirse el volumen del trofozoíto, se colapsa formando pliegues que semejan cordones sobre la superficie. Posteriormente la síntesis de pared continúa formando nuevas estructuras como pliegues, aumentando el grosor y altura de los mismos. Se propone una secuencia hipotética de pasos en el desarrollo de la formación de la pared.

I N T R O D U C C I O N

El estudio de las amibas del género **Entamoeba** resulta especialmente importante porque incluye especies parásitas para el hombre y algunos animales. Las dos especies más conocidas y estudiadas son **Entamoeba histolytica**, Schaudinn, 1903 y **Entamoeba invadens**, Rodhain, 1934.

Semejante a otros protozoarios de vida libre, el ciclo de vida de **Entamoeba** se desarrolla a través de una alternancia de crecimiento trofozoítico y la formación periódica de quistes. El conocimiento del ciclo de vida de estas amibas parásitas requiere estudios del estado trofozoítico, del quiste, del enquistamiento y del desenquistamiento. El estudio del trofozoíto normalmente está encaminado hacia el conocimiento de la patogénesis y es donde existe una mayor información al respecto. El quiste, -- sin embargo, aún siendo la forma infecciosa, ha sido relativamente menos estudiado, así como el proceso mismo del enquistamiento, el cual, implica una serie de complejos cambios morfológicos y bioquímicos poco conocidos.

La amibiasis representa un grave problema de salud pública en México y otros países en desarrollo. Esta enfermedad, cuyo agente causal es **Entamoeba histolytica**, es típica de países con clima tropical, sin embargo, la disentería amibiana es bastante ubicua y se le encuentra también en regiones templadas; aunque se manifiesta con mayor frecuencia y con cuadros clínicos más severos en países tropicales y subtropicales con bajo nivel socio económico en donde la sanidad ambiental y la alimentación son deficientes (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970; Gutiérrez y Col., 1976; Kayan, 1976; WHO, 1969).

Por otra parte, el cuidadoso estudio de Geiman y Rattcliffe (1936), tanto in vivo como in vitro, les condujo a concluir que **E. invadens** y **E. histolytica** son extraordinariamente semejantes. Según McConnachi (1955), esta semejanza se extiende a los procesos de diferenciación y desarrollo metaquístico, de manera que una descripción de estos procesos en una especie podría ser aplicable a la otra, y que desde los puntos de vista de morfología y patogenicidad, aunque en huéspedes diferentes, la semejanza entre **E. invadens** y **E. histolytica** es mayor que la que existe entre

otras especies del mismo género.

Las razones anteriores justifican por que **E. invadens**, parásito de reptiles (Rodhain, 1934) es utilizado como modelo biológico experimental para la investigación en amibiasis, particularmente en aspectos de diferenciación. Por otra parte, la búsqueda de los interesantes e importantes mecanismos que están involucrados en la diferenciación celular y en particular en el enquistamiento de **Entamoeba** como procesos fundamentales de la fisiología celular no requieren, por sí mismos, de ninguna justificación.

A N T E C E D E N T E S

Una enfermedad de reptiles con un parecido a la amibiasis en el hombre fué descrita en 1933 y asociada directamente con **Entamoeba** sp. - - - - - (Ratcliffe y Geiman, 1933). Sin embargo, fué hasta 1936 que se estableció que este organismo es muy similar a **Entamoeba histolytica** tanto en morfología del trofozoíto y del quiste como en los procesos de enquistamiento y desenquistamiento y en los cambios metaquísticos (Geiman y - - - Ratcliffe, 1936).

El primer estudio al microscopio electrónico de amibas de **Entamoeba invadens** crecidas axénicamente fué realizado por Siddiqui y Rudzinska (1965), quienes describieron que la amiba está limitada por una membrana citoplasmática de aproximadamente 280 Å de grosor. El mayor componente del citoplasma son vacuolas con diámetros de 0.2 a 3.0 u, las cuales carecen de estructura, poseen baja densidad y están limitadas por una membrana limitante del mismo grosor y densidad que la membrana plasmática, sugiriendo que la membrana plasmática da origen a la membrana vacuolar en el proceso de pinocitosis. No se encontraron ni mitocondrias ni aparato de Golgi. El retículo endoplásmico, si existe, está pobremente desarrollado. El citoplasma presenta dos tipos de partículas, unas de baja densidad de 200-300 Å, y otras de 400-700 Å de mayor densidad, éstas últimas posiblemente representan partículas de glucógeno. La membrana nuclear es doble y hay pocas discontinuidades, las que pueden representar poros. La cromatina permanece inmediatamente debajo de la membrana nuclear, junto con la presencia de vesículas intranucleares dentro de la capa de cromatina. Entre las estructuras del citoplasma, los cuerpos cromatoides, son característicos de quistes, prequistes y trofozoítos con lento o nulo crecimiento. Barker y Deutsch (1958) en un estudio por medio de microscopio electrónico describieron cuerpos cromatoides en trofozoítos de - - - **Entamoeba invadens** crecidos en un medio no axénico, aunque éstos más pequeños y más numerosos que los descritos en los quistes y mediante estudios histoquímicos demostraron que los cuerpos cromatoides consisten principalmente de ácido ribonucléico y proteínas inespecíficas, además mediante es

tudios también con microscopio electrónico demostraron que las partículas globulares las cuales forman los cuerpos cromatoides se aplanan después de tratamiento con ribonucleasa. Calcularon en 200 Å de diámetro las partículas que forman las hélices de los cuerpos cromatoides y un tamaño promedio de los cuerpos cromatoides sobre 0.5 u, aumentando éste con la edad del cultivo de los trofozoítos y decreciendo otra vez en el quiste.

Mediante microscopía de luz ultravioleta (U.V) Barker y Svihla (1964) estudiaron la distribución celular de material con absorción máxima de -- 265 nm en muestras de cultivos completos de **Entamoeba invadens** obtenidos a intervalos de tiempo durante el crecimiento y maduración de quistes. La absorción en el citoplasma aumentó gradualmente conforme los trofozoítos se aproximaban a períodos de máximo enquistamiento. En trofozoítos tardíos y formas prequísticas, el material absorbente se encontró en pequeños cuerpos los cuales se agregaban para formar grandes cristales de muy alta absorción específica, la máxima cristalización ocurrió en quistes tempranos, donde ensayos citoquímicos mostraron que los grandes cristaloides son ribonucleoproteína. Micrografías electrónicas mostraron que los cristaloides están formados por partículas de 200 a 300 Å de diámetro. Durante la maduración del quiste no se apreció reducción en la absorción del quiste, pero los grandes cuerpos se fragmentaron en unidades más pequeñas hasta -- que finalmente solo quedó una muy alta absorción difusa por el quiste completo. Por estos y otros resultados los autores proponen la hipótesis de que los grandes cristaloides (cuerpos cromatoides) son una manifestación de un mecanismo adaptativo huésped-parásito, donde la ribonucleoproteína es sintetizada bajo condiciones favorables, cristalizada en el resistente estadio de quiste, y dispersada en la nueva amiba desenquistada habilitándola para establecerse en un nuevo huésped para un período de rápido crecimiento.

Baker (1963), utilizó la tinción negativa en fracciones particuladas de **E. invadens** obtenidas mediante un fraccionamiento con ácido ascórbico como antioxidante y variaciones en la concentración de magnesio para controlar el estado de agregación de las partículas de 150-660 Å de diámetro, tal diversidad fué debida a la agregación de diferentes combinaciones de dos tipos de partículas semejantes a ribosomas de 150 a 250 Å de diámetro.

Tales resultados dieron lugar a la hipótesis de que los cuerpos cromatoides representan un estado de agregación cristalina de ribosomas, lo que hace poco probable la interpretación sugerida por algunos autores que plantean la posibilidad de que los cuerpos cromatoides representan acúmulos cristalinos de partículas de algún virus citoplasmático.

Por otra parte, Czeto y col. (1973), mediante un estudio por microespectrofotometría de cuerpos cromatoides de *E. invadens* encontraron que el espectro de absorción cambió de un solo pico a 275 nm observado en quistes recién formados a dos picos, uno de 260 nm y otro de 310 nm observado en quistes con 24 horas de envejecimiento. Los autores atribuyeron estos cambios a la oxidación del triptofano a formilkynurenina y la hidrólisis de formilkinurenina a kinurenina.

Kusamrarn y col. (1975) encontraron que hélices y agregados de hélices (cuerpos cromatoides) se forman abundantemente en trofozoítos que crecen activamente en presencia de diversos inhibidores de síntesis de proteínas, (NaF, Cicloheximida, Actinomicina D). Estos cuerpos cromatoides son estructural y citoquímicamente idénticos a los encontrados en quistes. No encontraron evidencia de ningún organizador estructural ni de requerimiento de actividad metabólica para la formación de las hélices, por lo que concluyeron que la formación de las hélices inducidas por inhibidores de la síntesis de proteínas es un proceso espontáneo en el que los ribosomas maduros provenientes de polisomas se agregan en forma cristalina. En sus resultados no encontraron razones para relacionar la agregación de ribosomas en hélices o cuerpos cromatoides con el proceso de diferenciación o estados específicos del ciclo celular, sin embargo, sugieren alguna analogía entre el mecanismo de formación de hélices en *Entamoeba* propuesta por ellos y, por ejemplo la cristalización de ribosomas en embriones de pollo en hipotermia (Morimoto y col, 1972); en ambos sistemas los agregados parecen formarse a partir de monosomas inactivos, maduros y libres de mensajeros. Asimismo Morimoto y col. (1972a), encontraron que el arreglo básico del cristal ribosomal del embrión de pollo en hipotermia es un tetrámero no asociado a mensajeros, e indican además que los tetrámeros se forman a partir de monosomas liberados de polisomas y la posibilidad de que los tetrámeros se puedan formar a partir de ribosomas no programados para la

síntesis de proteínas, sintetizados inmediatamente antes de la cristalización o durante el congelamiento.

En un trabajo posterior Kusamrarn y col. (1975a) comparando propiedades estructurales, de sedimentación y de actividad en síntesis de proteínas de ribosomas obtenidos a partir, ya sea de polisomas o de hélices de **Entamoeba invadens**, concluyeron que los ribosomas de polisomas y hélices de **Entamoeba invadens** son probablemente idénticos y que la habilidad para formar hélices es una propiedad intrínseca de los ribosomas maduros libres de RNA mensajero. Se encontró que tanto los ribosomas de trofozoítos como de quistes eran activos para sintetizar proteínas en sistemas libres de células, aunque la actividad en extractos de quistes requirió la adición de la fracción soluble de trofozoítos.

Por otra parte, muchas veces la variación de un factor del medio trae consigo un cambio en la fisiología de la célula, y el cambio en la fisiología comúnmente involucra un cambio en la ultraestructura de la misma, - por ejemplo, Ludvick y Shipstone (1970), confirmaron la ausencia del Complejo de Golgi en **E. histolytica**, pero Treviño y Feria (1971) encontraron que bajo la acción de ciertas drogas hay la formación de vacuolas en disposición muy similar al complejo de Golgi, así como la aparición de prominente retículo endoplásmico. Asimismo, Chang (1946) encontró que existe una estrecha relación entre el potencial de óxido-reducción del cultivo - y el crecimiento, enquistamiento y desenquistamiento de **E. histolytica**, y que la relación entre el potencial de óxido-reducción y pH es crítica para la inducción del enquistamiento pero, posteriormente, Balamuth (1961), encontró que los potenciales de óxido-reducción no mostraron ninguna relación con el enquistamiento. las diferencias de resultados de los autores anteriores podrían ser explicados por diferencias en el cultivo, indicando la dramática influencia que el cambio de un factor del medio de cultivo - puede producir en la fisiología y estructura de **Entamoeba**.

En otro aspecto, el conocimiento de los procesos bioquímicos y fisiológicos involucrados en el enquistamiento amibiano, particularmente de especies patógenas, se había visto frenado por la carencia de medios de cultivo axénicos inductores del enquistamiento masivo **in vitro**. Los primeros -

das, pero ninguna relación fué encontrada en cepas de *E. invadens*.

Chang (1942, 1946) ha relacionado el enquistamiento de *E. histolytica* con ciertas condiciones de pH y potencial de óxido-reducción, pero él mismo también ha sugerido que es posible que los cambios en los potenciales de óxido-reducción, lo cual acontece en el enquistamiento, es una consecuencia de otras condiciones asociadas a la formación de quistes, más bien que el factor inductor del enquistamiento mismo.

En enquistamiento en masa de *E. invadens* pudo ser estimulado en cultivos de amibas crecidas con bacterias en un medio conteniendo almidón insoluble (Balamuth, 1962), sin embargo, este sistema es poco deseable para el estudio de mecanismos de diferenciación debido a la presencia de otros organismos metabólicamente activos y a los componentes insolubles que complican la obtención de quistes maduros.

Thepsarungsikul y col. (1971) desarrollaron un método para inducir enquistamiento masivo de *E. invadens* en cultivos monoaxénico o axénico en un medio monofásico. El procedimiento involucra la transferencia de trofozoítos de un medio de crecimiento axénico (TP-S-I) (Diamond, 1968) a otro de enquistamiento que contiene suero y que ha sido condicionado por crecimiento de bacterias en él, previo a su esterilización e inoculación con amibas. Si tal medio carece de acondicionamiento los trofozoítos no se enquistan -- lisándose generalmente. Varias cepas de bacterias pudieron condicionar eficientemente el medio de enquistamiento y los quistes producidos axénicamente fueron indistinguibles de los obtenidos a partir de cultivos monoaxénicos.

Rengpien y Bailey (1975) describieron una nueva técnica a través de la cual se induce el enquistamiento masivo de *E. invadens* en un medio axénico sin necesidad de condicionar previamente el medio con bacterias. En este medio, el enquistamiento masivo ocurre dentro de las 30-48 horas luego de que trofozoítos de *E. invadens* de la cepa IP-1 crecidos axénicamente son transferidos a este medio antes de que entren en fase estacionaria produciendo un enquistamiento de aproximadamente 70 %. Enquistamiento de *E. invadens* de la cepa PZ ocurre de una manera similar pero con menos reproducibilidad. Sin embargo, *E. histolytica* no enquista en este medio.

Das y col. (1980) publicaron un método de enquistamiento axénico para *E. invadens* en un medio hipotónico salino sin nutrientes orgánicos. $MgCl_2$ (30 mM), $CaCl_2$ (30 mM), así como NaCl (45 mM), inducen enquistamiento a 22°C. Sin embargo, a 30°C las amibas se lisan. El enquistamiento no ocurrió en agua destilada o NaCl isotónico a ninguna de las dos temperaturas. Por otra parte Vazquezdelara-Cisneros y Arroyo-Begovich (1984) han desarrollado un procedimiento para inducir enquistamiento axénico de *Entamoeba invadens*, eliminando la glucosa en el medio de crecimiento TYI-S-33 (Diamond, 1978). El tiempo transcurrido para iniciar el enquistamiento fué dependiente de la densidad del inóculo; un cultivo de 1×10^5 cel/ml requirió sólo de 8 h para iniciar el enquistamiento. La producción de quistes fué óptima (70%) cuando se empleó una densidad de 5×10^5 cel/ml. Bajo las condiciones anteriores, el suero fué totalmente necesario, pero no las vitaminas. El enquistamiento pudo ser disparado sin cambios en la osmolaridad del medio, y el oxígeno no influyó en este proceso.

De acuerdo con lo anterior se cuenta ya con técnicas que permiten la inducción *in vitro* del enquistamiento masivo y reproducible en *Entamoeba invadens*, pero aún es notable el gran hueco de conocimiento en relación a que o cuales factores son en última instancia los verdaderamente inductores del enquistamiento.

En base a los datos ya mencionados de Ludvick y Shipstone (1970), Treviño y Feria (1971), Chang (1946) y Balamuth (1961). Los cuales demuestran la importancia que el cambio de un factor del medio de cultivo puede producir en la fisiología y estructura de *Entamoeba*, y en los datos de Band y Cirrito (1979) en cuanto a la necesidad de CO_2 para el crecimiento de *E. invadens* y su baja tolerancia al oxígeno, uno de los objetivos que se plantearon para esta tesis fué la investigación de posibles cambios en la ultraestructura de trofozoítos de *E. invadens* crecidos con alta tensión de CO_2 . Además, dado el hallazgo de Ramos (1987) en un trabajo preliminar de esta tesis en el que observó la presencia de cuerpos cromatoides en trofozoítos de *E. invadens* en fase de crecimiento activo cultivados en medio TP-S-1 con alta tensión de CO_2 , aunado al hecho de que los cuerpos cromatoides son estructuras invariables en quistes y prequistes de *Entamoeba*, y que los diversos medios de enquistamiento axénico para *E. invadens* omiten

la glucosa, un segundo objetivo de esta investigación fué el de probar la posible inducción de enquistamiento de trofozoítos de **Entamoeba invadens** - crecidos en medio TP-S-1 con alta tensión de CO_2 y ayuno de glucosa.

Por otra parte, de los resultados obtenidos de la búsqueda de las respuestas a las preguntas implícitas en los objetivos ya mencionados, se derivaron nuevas preguntas con respecto a la morfogénesis de la pared. A este respecto, Chávez y col. (1978) han encontrado que la pared de los quistes de **E. invadens** está formada por una malla fibrilar compacta de 100 a 140 nm de espesor, situada sobre la membrana plasmática. Se resalta que existe gran semejanza entre el material fibrilar que integra la pared del quiste, con la del contenido de vacuolas citoplasmáticas que con frecuencia se encontraron adosadas a la cara interna de la membrana plasmática.

Arroyo Begovich y col. (1982) demostraron que la pared de quistes de **E. invadens** está constituida por estructura microfibrilar y que las microfibrillas están estretejadas y distribuidas al azar, además mediante estudios citoquímicos y de difracción de rayos X, demostraron también que el único polímero cristalino que constituye las microfibrillas es quitina.

Los trabajos de naturaleza morfológica sobre la superficie celular de amibas, han sido enfocados a observar diferencias entre los estadios de trofozoíto y quiste, y no teníamos conocimiento de algún estudio en el que se determinaran los cambios morfológicos de la superficie celular o la forma en la cual la pared del quiste (quitina) va siendo depositada durante el proceso de diferenciación.

La observación de algunas fotografías de quistes de **E. invadens** teñidos con calcofluor white M2R (Arroyo-Begovich y col. 1978) (un colorante fluorescente con afinidad por polímeros de glucosa (Peters y Latka, 1986)) hizo nacer la hipótesis de la posibilidad de que la pared del quiste fuera formada gradualmente desde uno o varios orígenes avanzando gradualmente sobre la superficie, dada la fluorescencia de quistes en forma de "parches" o de "cuarto creciente". Si esto fuera así, ésta idea podría ser probada a través de microscopía de barrido, mediante el análisis progresivo de varios tiempos durante la formación del quiste.

El comprobar la anterior hipótesis y la caracterización de la superficie de la pared de los quistes de **E. invadens** obtenidos con medio AEM y con alta tensión de CO₂ fué un tercer objetivo de esta investigación.

M A T E R I A L E S

Origen de los reactivos

Se obtuvieron de Productos Químicos Monterrey, S. A.: hidróxido de sodio, acetato de uranilo, fosfato monobásico de potasio y fosfato dibásico de potasio; de Merck México, S.A.: alcohol etílico, citrato de plomo, peptona de caseína, L-cisteína, ácido ascórbico y azul de toluidina; de Técnica Química, S. A. de México: cloruro de sodio y glucosa anhidra; de Bioxón de México, S.A.: extracto de levadura; de Ted Pella, Inc. Calif. U.S.A.: resina - Medcast, óxido de propileno y glutaraldehído; de Farmaceúticos Lakeside, S.A. de C.V.: penicilina-G sódica cristalina y sulfato de estreptomicina; de Paines & Byrne LTD. Greenford, Inglaterra: Panmede; de Sigma Chemical Company, U.S.A.: calcofluor M2R y tritón X-100; de Infra del Norte, S.A. de C.V.: CO₂ industrial y CO₂ de alta pureza 99.9% (nitrógeno, 50 ppm, -- oxígeno, 20 ppm, hidrocarburos, 10 ppm).

Material Biológico

Cepa amibiana:

Se utilizó la cepa IP-1 de *Entamoeba invadens* proporcionada por los laboratorios de Amibiasis Experimental y Biología Celular de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del noreste, I.M.S.S.

Suero bovino inactivado:

Se trabajó con suero bovino de las siguientes fuentes: Laboratorio del Dr. Rubén López Revilla, del Centro de Estudios Avanzados del I.P.N.; de AGRO, productos y subproductos de origen animal, Monterrey, N.L.; de Sigma Chemical Co. y de nuestro laboratorio. Parte del suero utilizado en este trabajo fué amablemente donado por el Dr. Salvador Said Fernández, por el M.C. Carlos Leal Garza y por el Dr. Angel Arroyo Begovich.

Medio de Cultivo TP-S-1 de Diamond (sin vitaminas)

COMPONENTES	CONCENTRACION (g/500 ml H ₂ O)
Peptona de Caseína	5.0
Panmede	10.0
D-glucosa anhidra	2.5
L-cisteína	0.5
Acido Ascórbico	0.1
NaCl	2.5
KH ₂ PO ₄	0.3
K ₂ HPO ₄	0.5

Los componentes se mezclaron y disolvieron en 60 ml de agua tridestilada - en ebullición. Se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos. Se aforó el sobrenadante a 500 ml con agua tridestilada estéril y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N. Se distribuyó en alícuotas de 9 ml en tubos de cultivo de 15 X 100 mm con tapón de hule y se esterilizaron a 15 lb/pulg²/15 min. Se almacenaron en la obscuridad a temperatura ambiente hasta su utilización. No se utilizó medio de cultivo con más de dos semanas después de su preparación.

Antes de ser inoculados, los tubos se complementaron con 1 ml de suero estéril inactivado de bovino y 0.1 ml de la solución de trabajo de penicilina-estreptomina (1000 X).

Medio Axénico de Enquistamiento (AEM)

COMPONENTES	CONCENTRACION (g/l)
Peptona de Caseína (Merck	5.0
Extracto de Levadura (Bioxón de México, S.A.)	5.0
KH_2PO_4 (Productos Químicos Monterrey, S.A.)	0.25
K_2HPO_4 (Productos Químicos Monterrey, S.A.)	0.55
Suero estéril inactivado de caballo	50.00 ml

Los cuatro primeros componentes se disolvieron en 900 ml de agua tridestilada estéril, se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 5 N y se agregó el suero de caballo. Se esterilizó por filtración a través de membranas Millipore con diámetro de poro de 0.22 μ y se recibió en frascos de 100 ml estériles. Se incubaron los frascos con el medio a 37°C durante 48 horas, transcurrido este tiempo, se pasaron a una temperatura de 4°C durante un mes para "maduración" del medio.

Preparación de la solución salina de fosfatos (PBS)

NaCl	6.5 g
K_2HPO_4	2.8 g
KH_2PO_4	0.4 g

Se disolvieron los componentes en aproximadamente 700 ml de agua tridestilada y se aforó a 1000 ml, se ajustó el pH a 7.4-7.5 con NaOH 10 N.

La solución se fraccionó en frascos con 100 ml y se esterilizaron por 15 minutos a 15 lb/pulg².

Preparación de la solución de penicilina - estreptomicina.

Solución concentrada de penicilina: a un frasco ampula de 1.000,000 de unidades de penicilina-G sódica cristalina se le inyectaron con jeringa - y aguja estériles, 5 ml de agua tridestilada estéril para disolver la penicilina.

Solución patrón de penicilina-estreptomicina: A un frasco ampula de sulfato de estreptomicina, se le añadió bajo condiciones de esterilidad, la solución concentrada de penicilina y se mezclaron.

Solución de trabajo de penicilina-estreptomicina (1000 X). Se pasó - - asépticamente toda la solución patrón de penicilina-estreptomicina del - - frasco ampula a una probeta estéril de 25 ml y se aforó a 20 ml con agua - tridestilada estéril. Se guardaron alícuotas de 5 ml en tubos con tapón - de rosca de 13 X 100 mm, etiquetados con la fecha de preparación y se almacenaron a -20°C cubiertos con papel aluminio.

Preparación de hidróxido de sodio 10 N

Se preparó disolviendo 40 g de NaOH aforando a 100 ml con agua destilada estéril.

Obtención y almacenamiento del agua tridestilada y esterilizada

Agua destilada electropura, se destiló nuevamente dos veces en un destilador de vidrio. El agua tridestilada se fraccionó en matraces iguales, - los cuales se esterilizaron inmediatamente a 15 lb/15 min y se etiquetaron con la fecha de esterilización.

Preparación de glutaraldehído al 2%

0.2 g de glutaraldehído en 100 ml de amortiguador de fosfatos 0.2 M - - pH 7.2.

Preparación de resina epoxi medcast

Mezcla A		Mezcla B	
Resina	80 g	Resina	100 g
DDSA	105.6 g	NMA	88.3 g

Mezcla final para incluir:

A	5 g
B	5 g
catalizador	0.14 g (DMP 30)

Preparación de acetato de uranilo

Solución saturada con agua destilada.

Preparación de Citrato de Plomo

Se disuelven 0.03 g de citrato de plomo en 10 ml de agua destilada hervida y fría y se agregan 2 a 3 gotas de NaOH 10 N. Se guardan en refrigeración en recipientes oscuros.

Preparación de azul de toluidina

Se disuelve 1 g de borato de sodio en 100 ml de agua destilada en ebullición y se agregan 0.5 g de azul de toluidina hasta disolver completamente. Filtrar y usar.

Buffer de fosfatos 0.2 M, pH 7.2

Solución A:

K_2HPO_4 31.53 g en 1000 ml de agua destilada.

Solución B:

KH_2PO_4 34.90 g en 1000 ml de agua destilada.

Se utilizaron 216.92 ml de solución A para 347 ml de la solución B, dando un volumen final de 563.92 ml.

Preparación de calcofluor M2R al 1%

1 g de calcofluor M2R se disolvió en agua destilada y se aforó a 100 ml.

Preparación de tritón X-100 al 1 %

1 ml de tritón X-100 se disolvió en agua destilada y se aforó a 100 ml.

M E T O D O L O G I A

Mantenimiento de la cepa

La cepa de *Entamoeba invadens* se mantuvo en medio TP-S-1 a través de re siembras sucesivas, antes de alcanzar su fase estacionaria.

Cinética de Crecimiento Normal

Se enfrió el tubo fuente de inóculo a 0-4°C durante 20 minutos para des pegar las células adheridas al tubo y se determinó el número de células por mililitro de medio. Se dispusieron series de 11 tubos conteniendo cada -- uno 10 mililitros de medio TP-S-1 más 0.1 ml de solución de antibióticos - de penicilina-estreptomicina y se inocularon con 4×10^3 células por mili- litro de medio, se incubaron a 25°C y se realizaron cuentas cada 24 h para determinar el incremento de células. Cada punto representa el promedio -- del valor de dos tubos.

Determinación de la densidad celular

Para determinar el número de células (trofozoítos), los tubos se enfria ron por 20 minutos a 0-4°C, se homogenizaron cuidadosamente por inversión y se contaron las células mediante una cámara hematocimétrica de Neubauer.

Inducción del Enquistamiento en Medio Axénico de Enquistamiento (AEM)

Cultivos de 4-5 días de edad en medio TP-S-1 modificado fueron coloca- dos a 0-4°C por 20 minutos y se determinó la densidad celular, posterior-- mente se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 minutos, se retiró el sobrena dante y la pastilla celular se lavó dos veces con PBS. Se ajustó el número de células a un inóculo entre $1-2 \times 10^6$ y se añadió a cada tubo 5 ml de -- AEM ($2-4 \times 10^5$ células por mililitro de AEM) más 0.05 ml de solución de -- trabajo de Penicilina-Estreptomicina (1000 X) y se incubaron a 25°C.

Cinética de crecimiento con alta tensión de CO₂.

El procedimiento fué igual que para la cinética de crecimiento normal - con la única diferencia de que antes de ser incubados, cada tubo fué gasea do con CO₂ como se describe enseguida.

Gaseo de los tubos con CO₂ (Alta tensión de CO₂)

Los tubos fueron cerrados con un tapón de hule atravezado con 2 agujas,

la más larga unida a una jeringa (sin émbolo) con un filtro de algodón y - la otra a una manguera de plástico también con filtro de algodón, todo ello estéril (véase fig. 1). El gas se hizo burbujear en el medio a través de la jeringa la cual se conectó a la fuente de gas (tanque de CO₂). El flujo de CO₂ fué de 0.2 l/min/2 min. Luego fueron retiradas las 2 agujas y - rápidamente sellado el tapón con silicón o vaselina para evitar la posible fuga del gas a través de los orificios dejados por las agujas.

Crecimiento de trofozoítos con alta tensión de CO₂ para observación en - - microscopía

Se utilizó un inóculo de 4×10^3 células por mililitro de *Entamoeba* - - *invadens* y fueron crecidas en cultivo axénico en 9 ml de medio TP-S-1 con 0.1 ml de antibióticos. Los tubos fueron gaseados con CO₂ como se ha des-- crito. Se incubaron a 25°C durante 1 a 10 días y las pastillas de células fueron obtenidas y procesadas para su observación en el microscopio elec-- trónico.

Inducción del enquistamiento con alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa

En una primera fase se dispuso una serie de tubos con 9 ml de medio -- TP-S-1 más 0.1 ml de la solución penicilina-estreptomina y se inocularon con 4×10^3 células por mililitro, fueron gaseadas con CO₂ y se incubaron a 25°C por 4-6 días. En la segunda fase los tubos se enfriaron a 0°C du-- rante 15-20 min y se centrifugaron a 1500 rpm por 2 min. Se eliminó el me-- dio de cultivo y se lavaron las células con 5 ml de PBS. Se agregó a los tubos 9 ml de medio TP-S-1 sin glucosa y 0.1 ml de solución de antibióti-- cos y nuevamente se gasearon como ya ha sido descrito. Los tubos se incuba-- ron a 25°C durante 60-90 h.

Observación con microscopía de fluorescencia

Quistes obtenidos, después de incubar trofozoítos por 60-90 h en medio sin glucosa y con alta tensión de CO₂ fueron lavados con PBS, tratados con tritón X-100 por 15 min, lavados con H₂O destilada y resuspendidos en PBS. Una gota de esta muestra fué colocada sobre un portaobjetos y sobre ella - se agregó una gota de calcofluor M2R al 1 % y se observó con luz U.V con un microscopio Zeiss de fluorescencia.

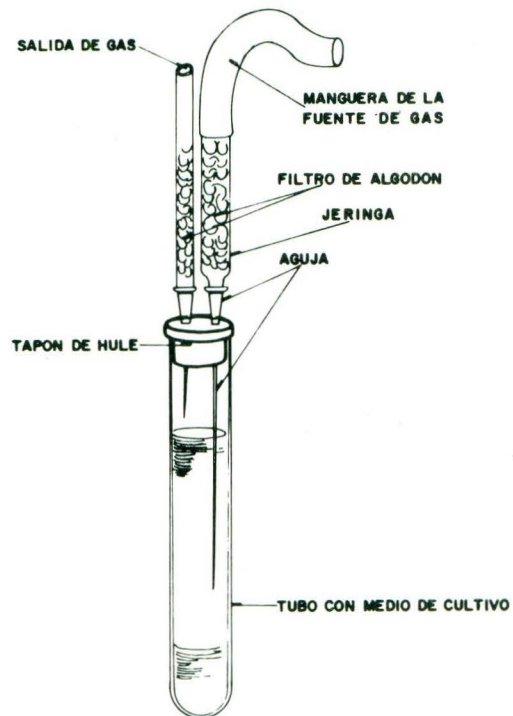


FIG. 1.- APARATO UTILIZADO PARA GASEAR LOS CULTIVOS CON CO₂.

Microscopía electrónica de barrido

Las muestras en medio TP-S-1 sin glucosa con CO_2 fueron centrifugadas a 1500 rpm/15 min y lavadas 2 veces con PBS para después ser fijadas con glutaraldehído al 2.5 % en buffer de fosfatos durante 24 h a 4°C, luego se lavaron con PBS y se deshidrataron con etanol 50, 70, 90 y 100 %, 10 min en cada uno de ellos. Las muestras fueron colocadas sobre cubreobjetos de 5mm de lado y se pasaron a una canastilla para introducirlas a un desecador de punto crítico CPA II-Technic durante 15 min a -10°C. Los cubreobjetos fueron luego colocados sobre portamuestras de bronce, utilizando cinta de doble pegamento. Las muestras fueron cubiertas con oro en un recubridor de capa fina Jeol JFC-1100, a una velocidad de depósito de 350 Å a 15-20 Kv durante 3 min,

Las muestras fueron posteriormente examinadas en un microscopio electrónica de barrido Jeol JSM-35C operado a 10-15 Kv. Se tomaron fotomicrografías utilizando películas Kodak VP-120.

Microscopía electrónica de transmisión

Los tubos fueron enfriados a 0-4°C por 20 min y centrifugados a - - - - 1000 rpm/5 min. La pastilla se lavó 2 veces con 5 ml de PBS y se fijó con glutaraldehído al 2 % en buffer de fosfatos por 24 h a 4°C. Se centrifugó y se lavó con solución PBS, luego se deshidrató en alcoholes al 60, 70, 80, 90 y 100 % por 15 minutos en cada uno, repitiendo una vez en los dos últimos.

Se agregó óxido de propileno y resina medcast en relación 1:1 por 3 h a temperatura ambiente. Se incluyó en resina medcast y polimerizó a 65°C -- por 24 h. Cortes finos teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo fueron analizados en un microscopio electrónico EM-109.

Prueba de viabilidad de quistes

Los cultivos fueron lavados con PBS estéril y tratados con tritón - - - X-100 al 1 % estéril por 20 min. Nuevamente se lavaron con PBS estéril -- (3 veces) y fueron resembrados en medio TP-S-1 e incubados a 25°C.

RESULTADOS

A. INDUCCION DE LA FORMACION DE CUERPOS CROMATOIDES EN TROFOZOITOS DE *Entamoeba invadens* POR ALTA TENSION DE CO₂

Efecto del CO₂ sobre el crecimiento de *Entamoeba invadens*.

La figura 2 muestra la cinética de crecimiento de *Entamoeba invadens* -- IP-1 en medio TP-S-1 normal (▲) y con alta tensión de CO₂ (○). Ambos cultivos se iniciaron con un inóculo de 4×10^3 cel/ml y mostraron una cinética de crecimiento lineal durante 6-7 días muy semejante entre sí, y un rendimiento máximo de 4×10^5 cel/ml a los 10 días de crecimiento. El tiempo de duplicación fué de aproximadamente 24 h. Estas características indican que todos los cultivos crecieron en óptimas condiciones mostrando asimismo que no hay diferencias notables entre el crecimiento con tensión normal y alta tensión de CO₂.

Inducción de Cuerpos Cromatoides y cambios en la ultraestructura de trofozoítos de *Entamoeba invadens* por alta tensión de CO₂.

A pesar de que no se notaron diferencias en la cinética de crecimiento y rendimiento total de los cultivos de *E. invadens* crecidos en presencia -- de una tensión normal y alta de CO₂, cuando las células provenientes de -- ambos cultivos se estudiaron por medio de microscopía electrónica se encontraron diferencias importantes.

La alta tensión de CO₂ en el medio de cultivo produjo notables cambios en la ultraestructura de trofozoítos de *E. invadens*. En las primeras 24 h crecidos en alta tensión de CO₂ exhibieron el núcleo con una mayor cantidad de cromatina periférica con aspecto de condensaciones discretas, acumuladas periféricamente en éste, ocupando una proporción bastante mayor del mismo con respecto al núcleo de las células testigo, aunque en otras células crecidas también con alta tensión de CO₂, estas condensaciones se observaron localizadas centralmente (Figs. 3, 4 y 5). Además, el citoplasma presentó una gran cantidad de pequeños gránulos con una tendencia a la -- agregación, aunque sin un patrón de distribución regular, pero con cierta

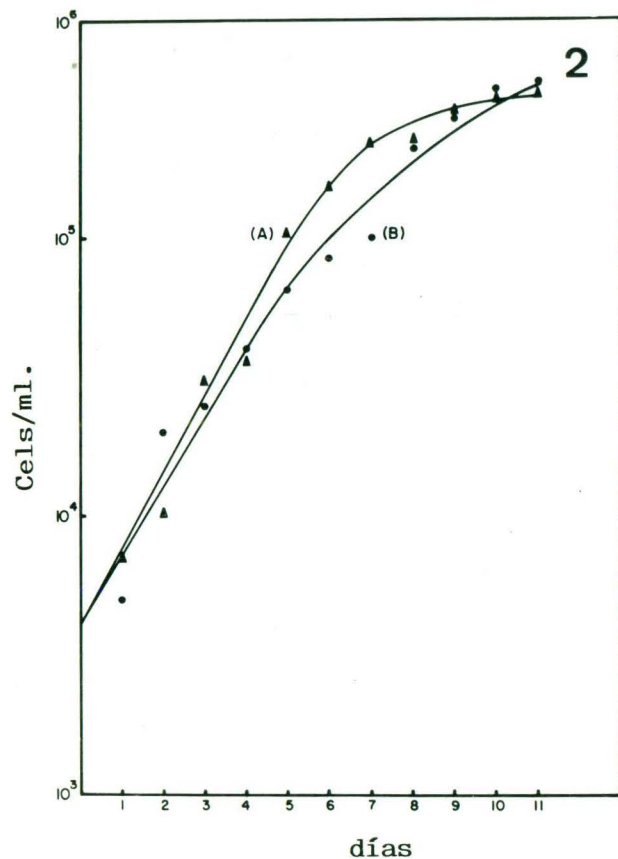


Fig. 2 Cinética de crecimiento de *E. invadens* IP-1 en medio TP-S-1. Curva A(▲) con tensión normal de CO₂. Curva B (●) con alta tensión de CO₂.

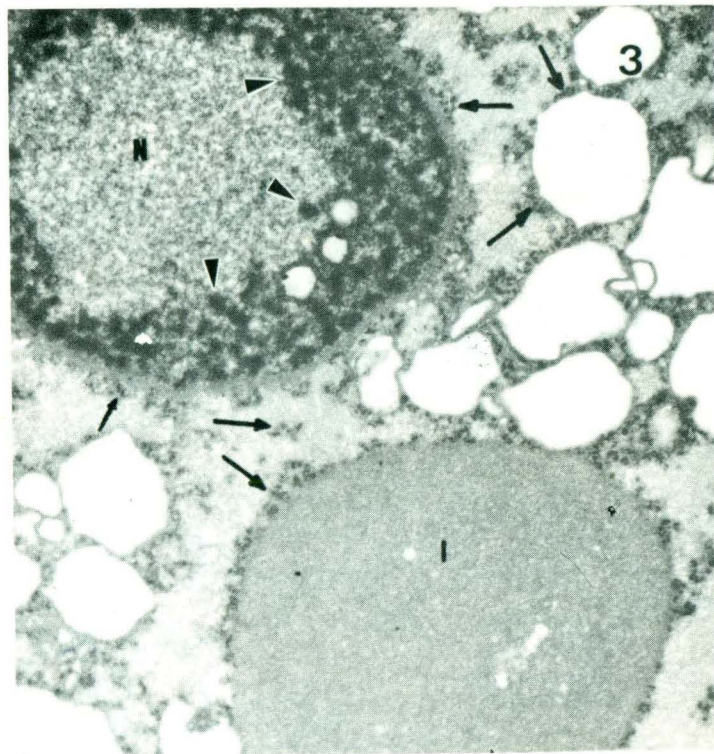


Fig. 3 Micrografía electrónica de un trofozoíto de *E. invadens* crecido por 24 h con alta tensión de --CO₂. En el núcleo (N), la heterocromatina se organiza en forma de gran número de condensaciones discretas (puntas de flecha). En el citoplasma son evidentes gran cantidad de gránulos con cierta afinidad por la membrana de vacuolas y membrana nuclear (flechas), posiblemente precursores de las hélices ribonucleoprotéicas de los cuerpos cromatóides. - Un gran cuerpo de inclusión (I) es evidente en el citoplasma. 13,000 X.

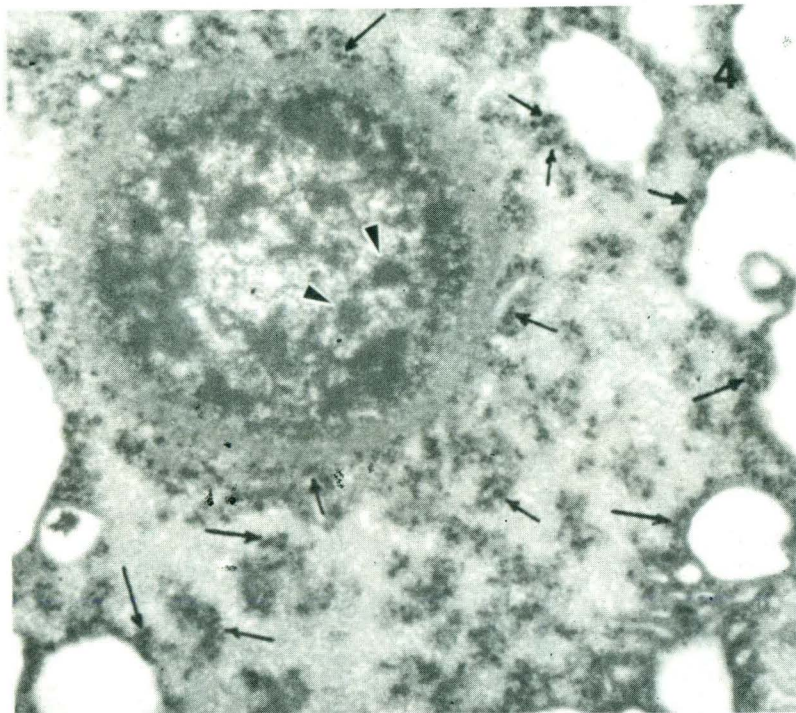


Fig. 4 Micrografía electrónica de un trofozoíto de *E. invadens* crecido por 24 h con alta tensión de CO_2 donde, excepto por el cuerpo de inclusión, se observan las mismas características que en la figura 3: Condensaciones de la cromatina (puntas de flecha) y gránulos citoplasmáticos, posibles precursores de las hélices ribonucleoprotéicas (flechas). 20,000 X.

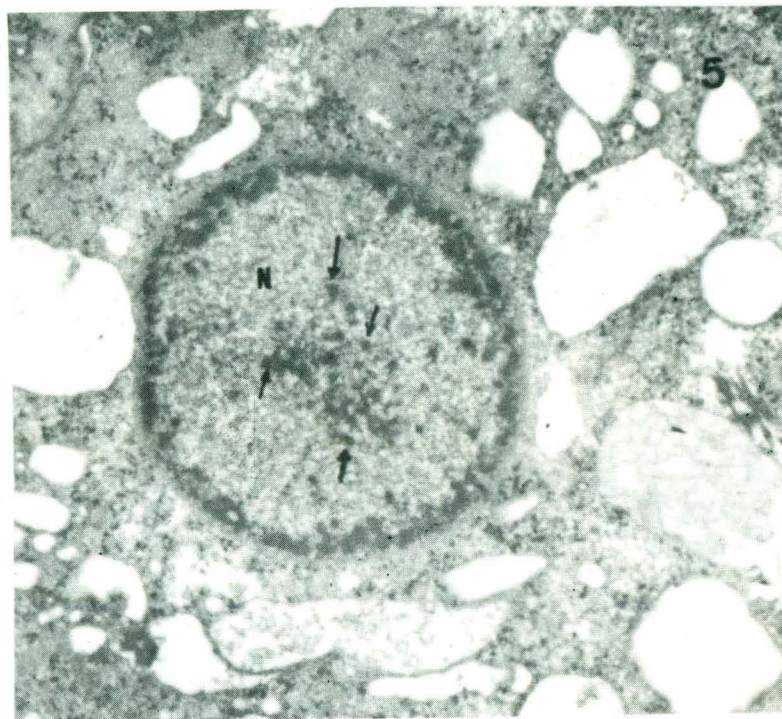


Fig. 5 Micrografía electrónica de un trofozoíto de *E. invadens* crecido por 24 h con alta tensión de CO_2 . Condensaciones de cromatina (flechas) se encuentran principalmente agrupados en el centro del núcleo (N). 12,000 X.

afinidad por las membranas de vacuolas y membrana nuclear (Figs. 3 y 4). - La figura 6 muestra un testigo en el que la cromatina periférica se muestra uniformemente dispersa y no se observan condensaciones de la misma. Asímimo no se observan gránulos citoplasmáticos.

A las 48 h con alta tensión de CO_2 , los cambios nucleares fueron menos notables y en general se apreció una tendencia a restablecer el patrón de estructura nuclear presente en los testigos (Fig. 7). Sin embargo, las oscuras partículas citoplasmáticas parecen ahora estar embebidas en una sustancia amorfa más opaca que el resto del citoplasma, pero siguiendo con -- la tendencia a mantener una estrecha relación con las vacuolas, ya que en general se les encuentra rodeando a éstas o parte de las mismas (Figs. 7 y 8). Además, aparecen por primera vez las estructuras helicoidales con ca--racterísticas iguales a las que forman los cristales ribosomales de los -- cuerpos cromatoides (Figs. 8 y 9), la estructura y tamaño de éstos es igual a las estructuras helicoidales encontradas en prequistes de *E. invadens* inducidos por el medio AEM (Rengpien y Bailey 1975). Tales estructuras helicoidales no tienen una localización definida en la célula y se encontraron desde cercanas al núcleo hasta cerca de la membrana nuclear. La figura 9 muestra también numerosos gránulos de alta opacidad a los electrones (puntas de flecha) que podrían ser las mismas estructuras helicoidales corta--das transversal u oblicuamente.

A las 72 h, la presencia de cuerpos cromatoides fué evidente y generalizada. La figura 10 muestra un corte semifino de trofozoítos crecidos por 72 h con alta tensión de CO_2 , donde se observan cuerpos cromatoides de diversos tamaños en varias células.

A las 96 horas (4 días), la presencia de cuerpos cromatoides fué también evidente en el citoplasma de trofozoítos. La figura 11 es una micrografía electrónica que muestra un trofozoíto con 4 días de crecimiento con alta -- tensión de CO_2 en los que se aprecian varios cuerpos cromatoides en sección transversal y longitudinal. El material denso amorfo permanece asociado alrededor de las vacuolas pero ya en general no se observan los agregados densos a los electrones asociados a este material denso amorfo como se observó a las 48 horas. Los testigos fueron semejantes a la fig. 6, donde es -- evidente la ausencia de cuerpos cromatoides, de hélices ribonucleoprotéicas

y de agregados de partículas densas a los electrones semejantes a ribosomas.

A los 5 y 10 días los cuerpos cromatoides siguieron presentes en trofozoítos crecidos con alta tensión de CO_2 . Tanto a los 5 como a los 10 días los cuerpos cromatoides fueron las estructuras más conspicuas del citoplasma además de las vacuolas (Fig. 12).

En síntesis, las observaciones sobre la formación de cuerpos cromatoides en trofozoítos crecidos con alta tensión de CO_2 puede resumirse en la forma siguiente (véase también la figura 13): Al primer día, en el citoplasma apenas se observan agregados de partículas densas a los electrones, pero se manifiestan profundos cambios nucleares en la organización de la cromatina periférica, sugestivo de cambios bioquímicos. Al segundo día aparecen ya las hélices ribonucleoprotéicas precursoras de los cuerpos cromatoides, y los agregados de partículas densas a los electrones están asociados a material denso amorfo. De los 3 a los 10 días los cuerpos cromatoides son estructuras más generalizadas y conspicuas en el citoplasma de los trofozoítos.

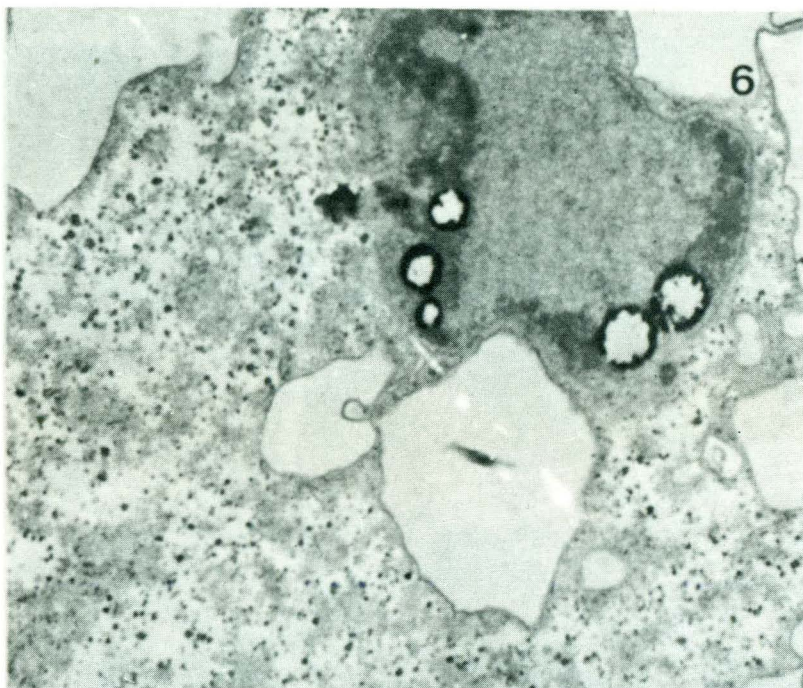


Fig. 6 Micrografía electrónica de un trofozoíto de *E. invadens* crecido por 24 h con tensión normal de CO_2 . Nótese la ausencia de condensaciones de cromatina. Los gránulos citoplasmáticos oscuros (posiblemente gránulos de glucógeno) tienen aspecto diferente a los observados en trofozoítos con alta tensión de CO_2 y no tienen afinidad por las membranas de vacuolas ni por la membrana nuclear (véase figs. 2 y 3). 13,000 X.

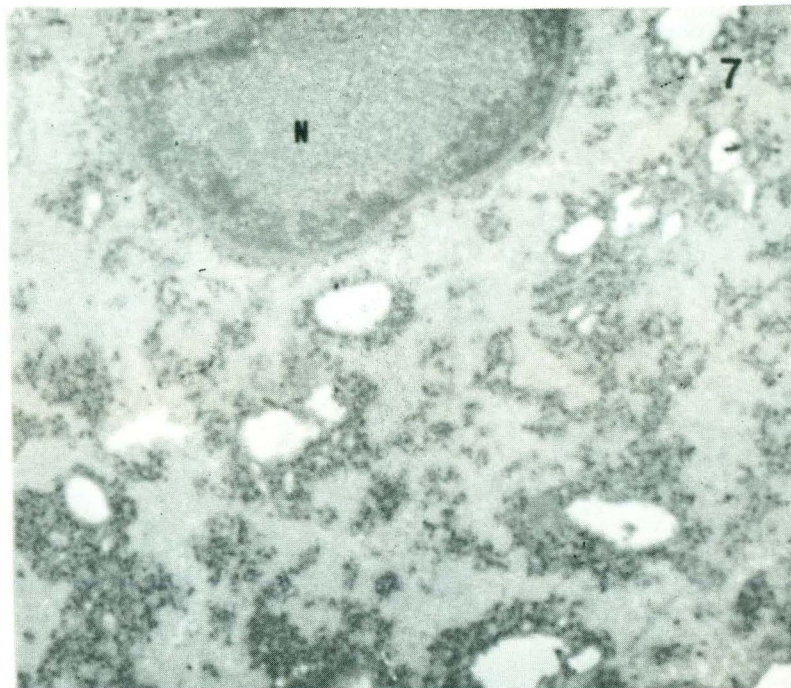


Fig. 7 Micrografía electrónica de un trofozoíto de *E. invadens* crecido por 48 h con alta tensión de CO_2 . En el núcleo (N) las condensaciones de cromatina aparentemente tienden a deshacerse notándose una tendencia a restablecer el arreglo normal como el testigo (véase figura 6). Los gránulos citoplasmáticos se ven ahora embebidos en zonas más opacas a los electrones que el resto del citoplasma y en estrecha asociación con las vacuolas. 12,000 X.

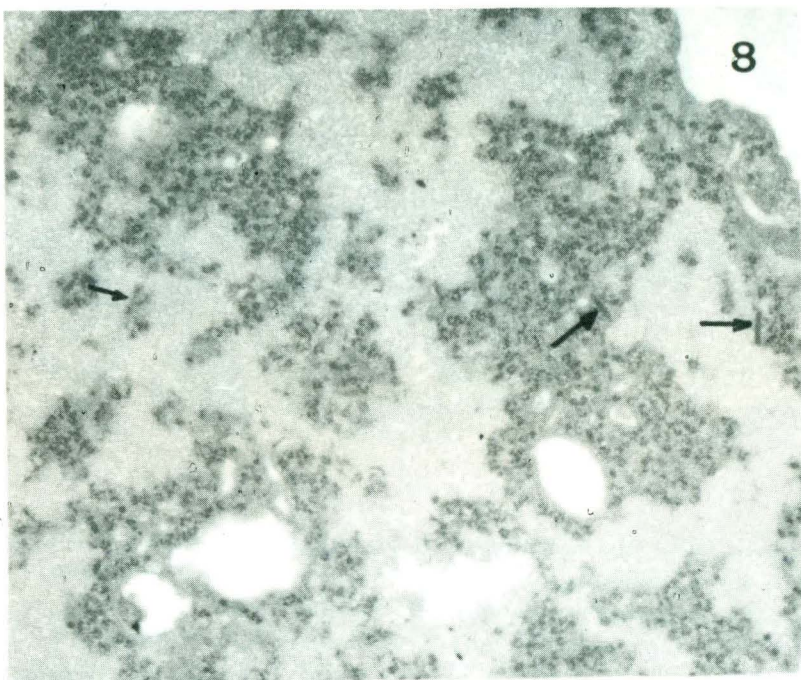


Fig. 8 Micrografía electrónica de un trofozoíto de *E. invadens* crecido por 48 h con alta tensión de CO_2 . Agregados de gránulos citoplasmáticos - son evidentes asociados a material oscuro, hélices ribonucleoprotéicas son señaladas por flechas. 20,000 X.

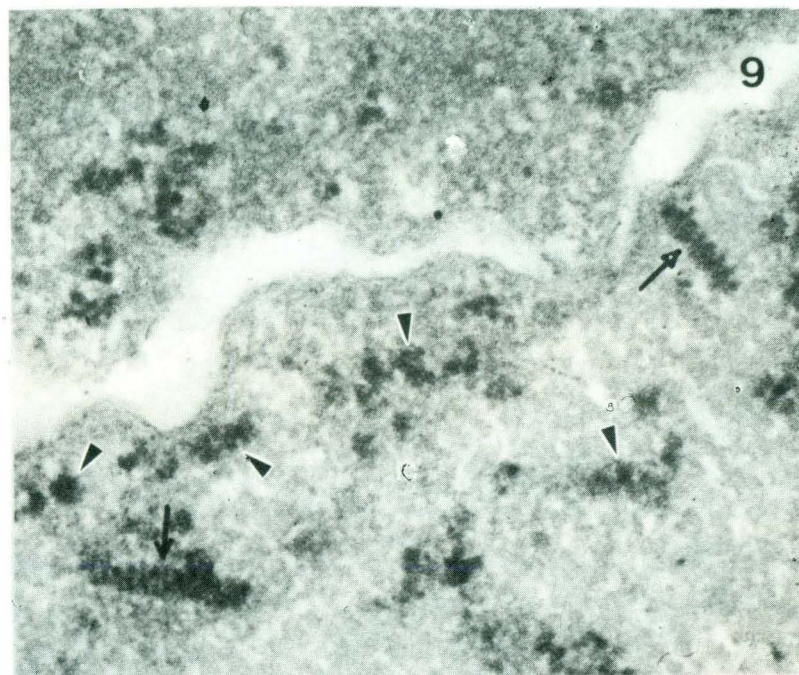


Fig. 9 Micrografía electrónica de un trofozoíto de *E. invadens* crecido por 48 h con alta tensión de CO_2 . Hélices ribonucleoprotéicas son claramente visibles (flechas), además de numerosos agregados de gránulos citoplasmáticos (puntas de flecha) que podrían representar estructuras helicoidales - cortadas transversal u oblicuamente. 70,000 X.

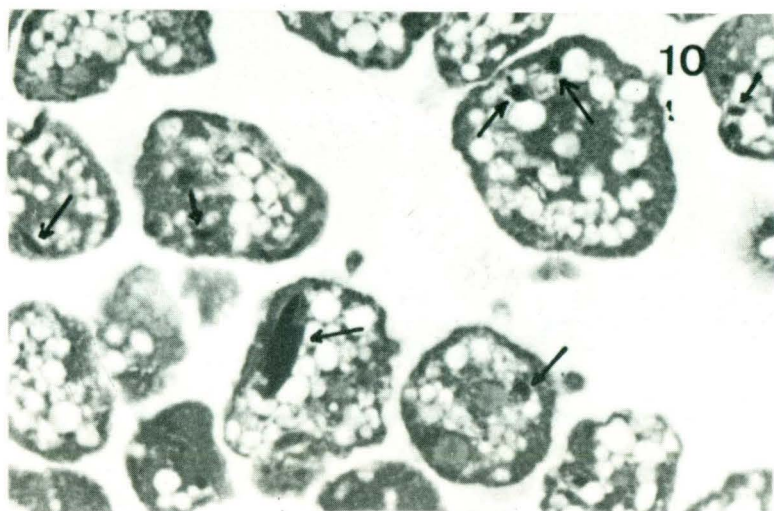


Fig. 10 Corte semifino de trofozoítos de *E. invadens* crecido por 72 h con alta tensión de CO_2 . Cuerpos cromatoides de diversos tamaños (flechas) son evidentes en numerosas células. 1,250 X.

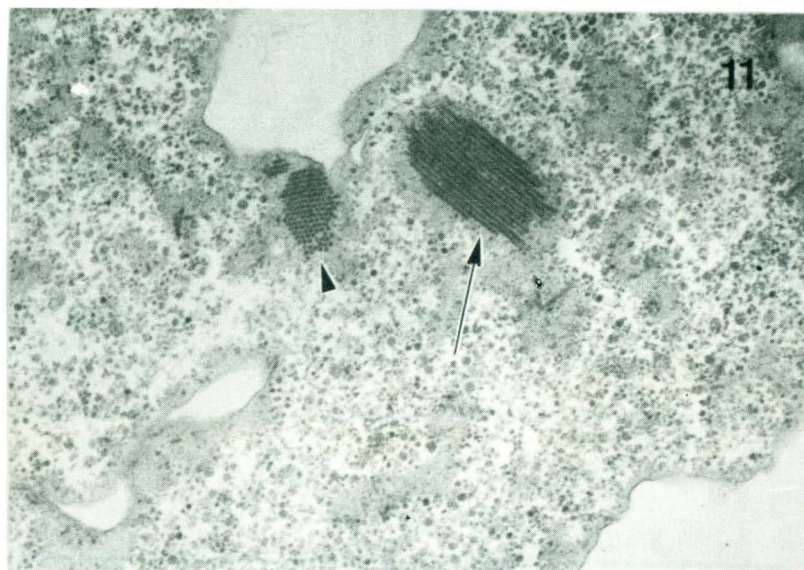


Fig. 11 Micrografía electrónica de un trofozoíto de *E. invadens* crecido por 96 h (4 días) con alta tensión de CO_2 . Se aprecian cuerpos cromatoides en sección longitudinal (flecha) y transversal (punta de flecha), ambos asociados a material denso amorfo. Los agregados de gránulos densos ya no se observan. Aproximadamente 24,000 X.

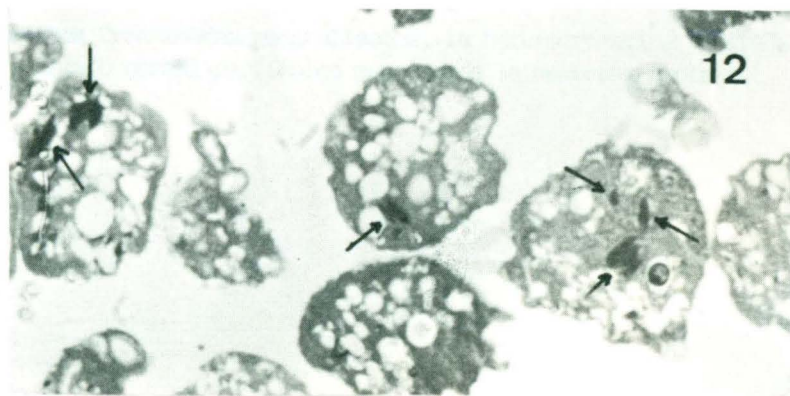
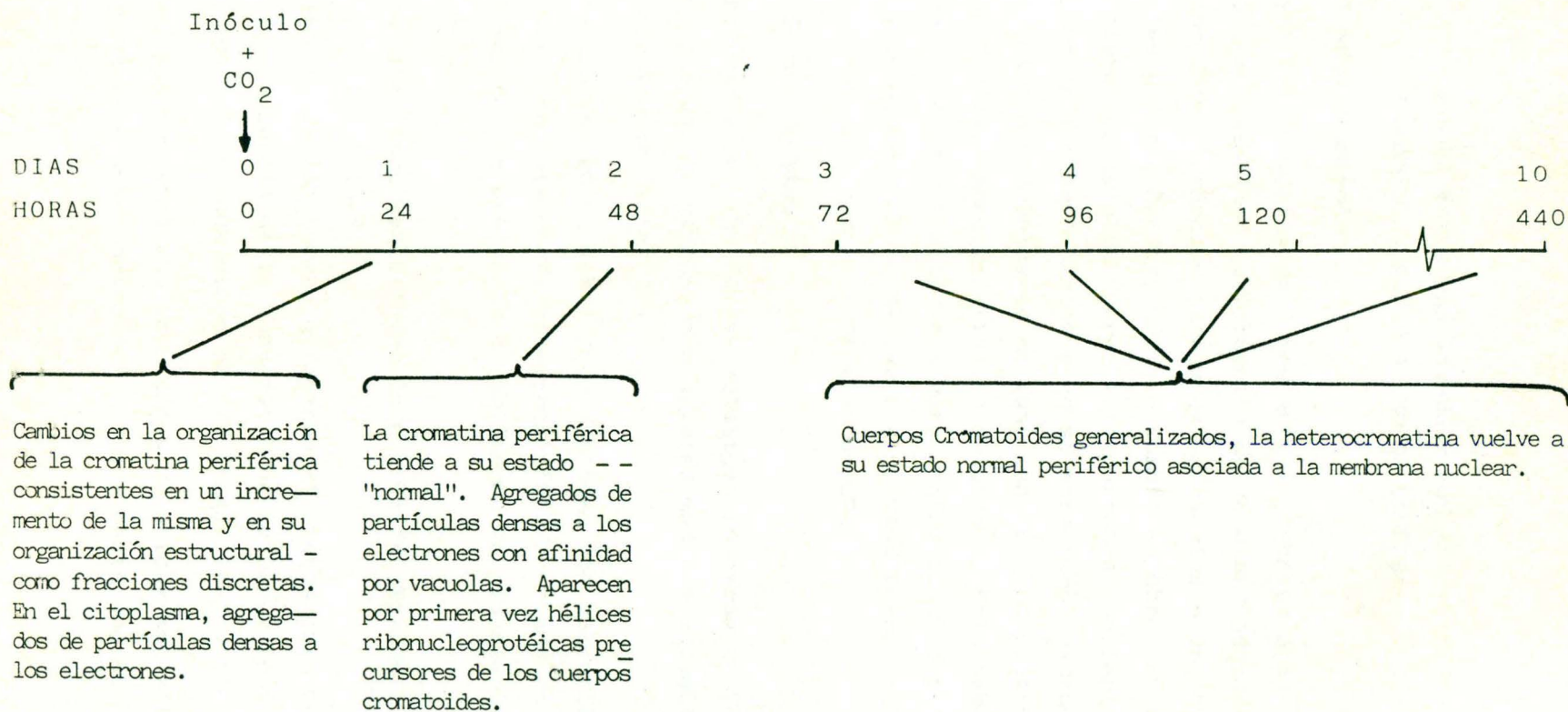


Fig. 12. Corte semifino de trofozoítos de *E. invadens* crecidos por 120 h (5 días) con alta tensión de CO_2 . Los cuerpos cromatoides son las estructuras más conspicuas del citoplasma. A los 10 días de cultivo con alta tensión de CO_2 no se vió diferencia con las células con 5 días de cultivo. 1,250 X.

Fig. 13 RESUMEN DE LAS OBSERVACIONES AL MICROSCOPIO ELECTRONICO EN RELACION A LA INDUCCION DE CUERPOS CROMATOIDES POR ACCION DEL CO₂ EN E. invadens



B. DIFERENCIACION DE *Entamoeba invadens* POR ALTA TENSION DE CO₂
EN COMBINACION CON AYUNO DE GLUCOSA

Inducción del Enquistamiento

La inducción del enquistamiento mediante la técnica descrita en material y métodos dió como resultado la formación de células redondeadas donde una gran proporción formó numerosos agregados semejantes a los observados con el medio AEM (Rengpien y Bailey, 1975). Cuando se observaron por microscopía de campo claro los quistes fueron transparentes y esféricos, aunque -- una gran proporción fueron ovoideos y no se apreciaron estructuras internas. Por microscopía de contraste de fase las células presentaron una refringencia periférica, característico en quistes de *Entamoeba*. El mayor -- rendimiento de estas formas quísticas varió entre 80-85 % y se alcanzó -- entre las 72 y 96 horas después de que las células fueron colocadas en medio TP-S-1 sin glucosa y con alta tensión de CO₂.

Caracterización del Quiste:

La demostración de que las formas quísticas formadas en TP-S-1 con alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa son quistes maduros y viables se realizó mediante los siguientes criterios:

- 1) Cuando las formas quísticas fueron tratadas con calcoflúor y observadas con U.V, una intensa fluorescencia fué observada en la superficie, lo que demuestra la presencia de polímeros de glucosa (pared) (Figs.- 14-A y 14-B).
- 2) Las formas quísticas resistieron la acción del Triton X-100 por 20 -- min. (Figs. 15-A y 15-B).
- 3) La observación de las formas quísticas al microscopio de barrido, demostró una apariencia de la superficie de la pared igual a la que presentaban los quistes obtenidos en AEM (Figs. 16-A y 16-B).
- 4) La microscopía demostró que las formas quísticas son multinucleadas y con numerosos cuerpos cromatoides, generalmente uno de gran tamaño -- (Fig. 17).

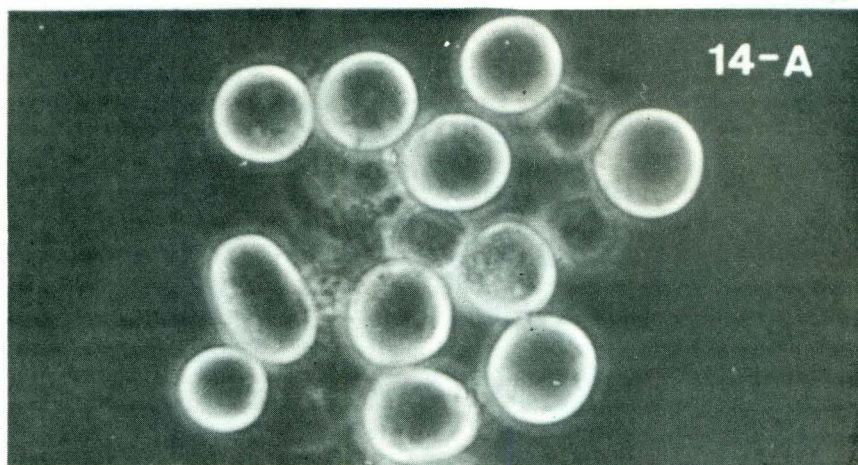


Fig. 14-A Quistes de *E. invadens* obtenidos con alta tensión de CO_2 y ayuno de glucosa y observados con microscopía de contraste de fase. Nótese la refringencia en la periferia de las células, característico de quistes. 1,250 X.

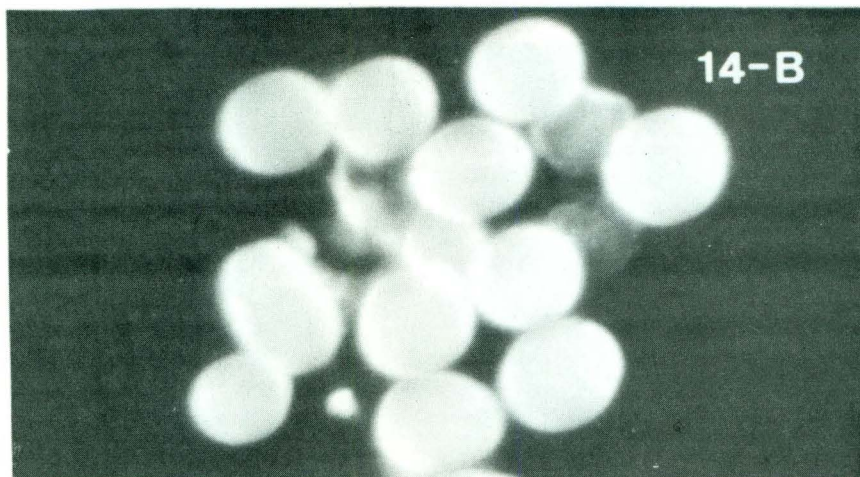


Fig. 14-B Micrografía del mismo grupo de células de la figura 14-A, pero tratadas previamente con calcofluor M2R y observadas por microscopía de fluorescencia. La fluorescencia es evidente en las estructuras que muestran refringencia en microscopía de contraste de fase en la figura 14-A. 1,250 X.

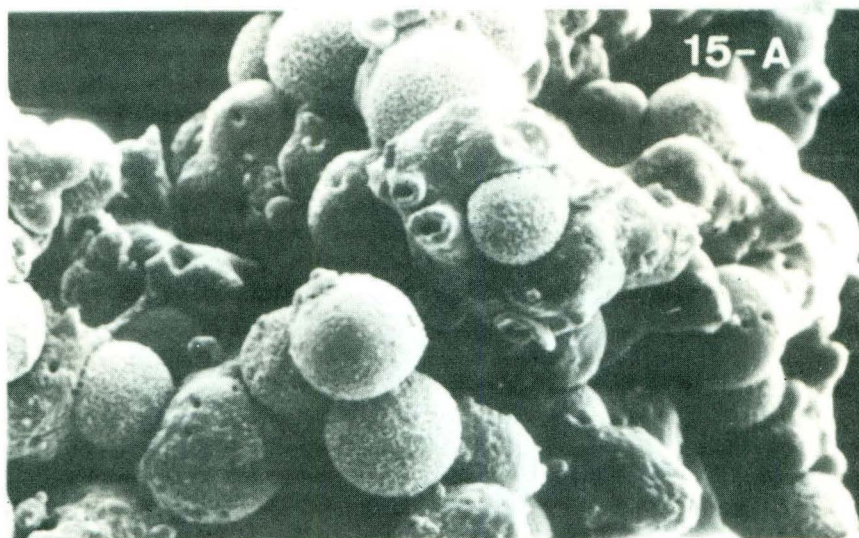


Fig. 15-A Fracción de una pastilla de células observadas por microscopía electrónica de barrido, después de 96 h en medio de enquistamiento con alta tensión de CO_2 . Es evidente la diferencia entre quistes y trofozoítos. -- Nótese que en relación al quiste el trofozoíto es aproximadamente 4 a 6 -- veces mayor. 1,600 X.

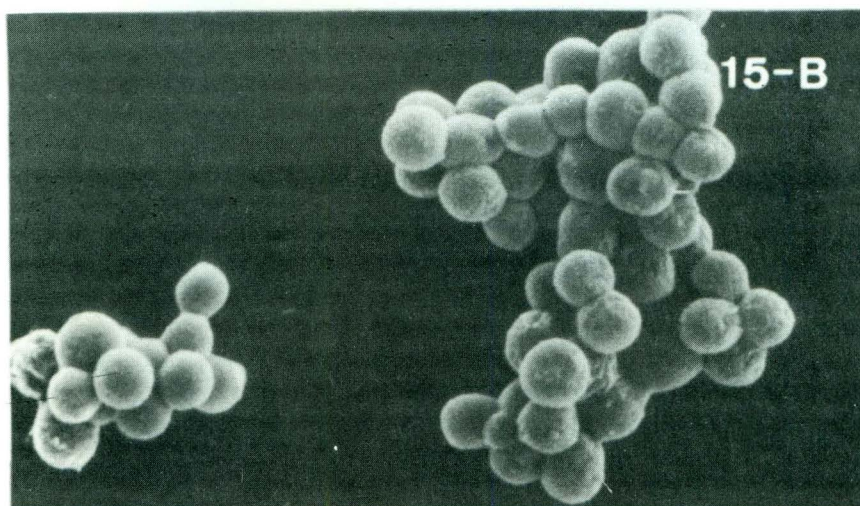
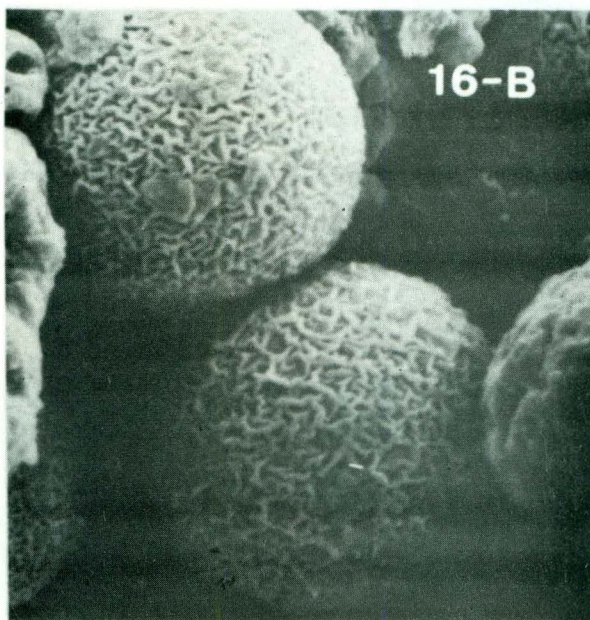
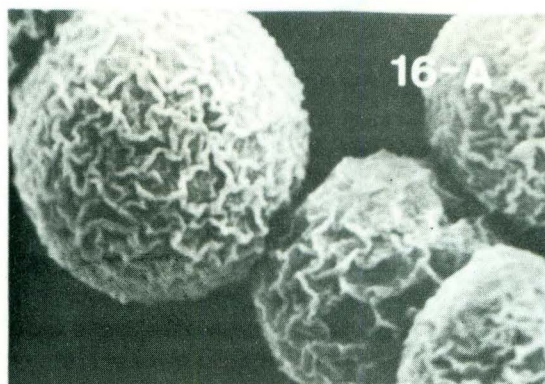


Fig. 15-B Fracción de la misma pastilla de la figura 15-A, la cual fué -- previamente tratada con tritón X-100 0.1 % por 20 min. Nótese la ausencia de trofozoítos. 780 X.



Figs. 16-A y 16-B Muestras de quistes obtenidos con alta tensión de CO_2 y con medio AEM (16-B). Nótese la gran semejanza de la superficie entre los quistes obtenidos por ambos métodos. Fig. 16-A 7,000 X. Fig. 16-B 6,000 X.

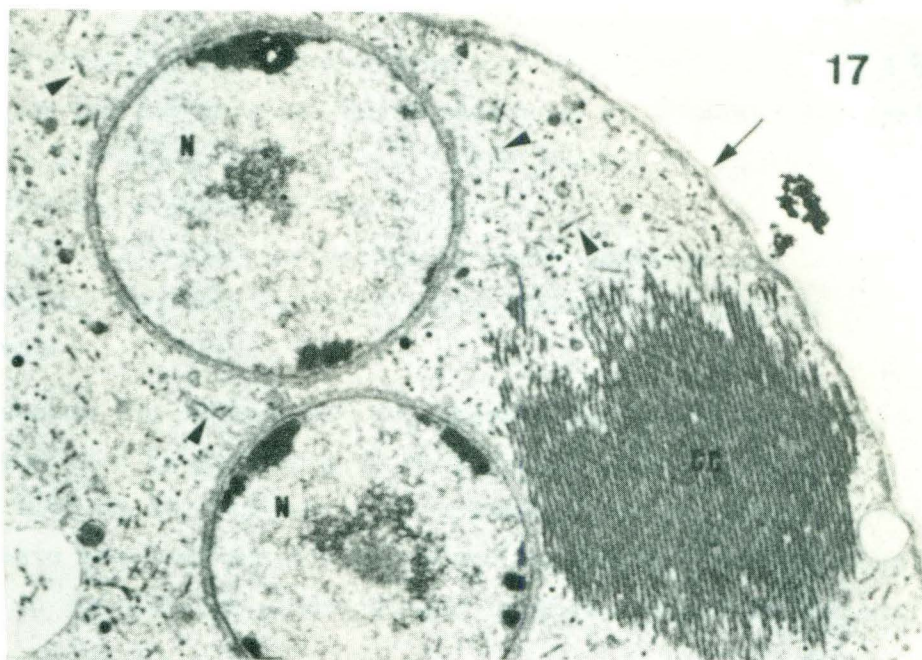


Fig. 17 Micrografía electrónica de una pastilla de quistes de *E. invadens* obtenida con alta tensión de CO_2 y ayuno de glucosa. Los quistes se observan multinucleados (N=núcleo), con un gran cuerpo cromatoide (CC) y hélices ribonucleoprotéicas dispersas en el citoplasma (cabezas de flecha). - La pared es claramente visible (flecha). 14,000 X.

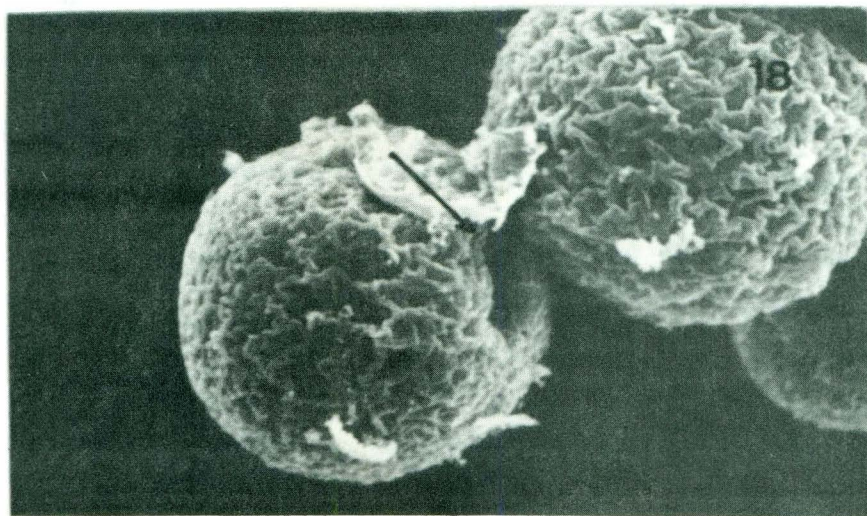


Fig. 18 Quiste de *E. invadens* inducido por alta tensión de CO_2 y ayuno de glucosa y observado por microscopía electrónica de barrido. Una cavidad en la superficie de la pared del quiste (flecha) fué observada frecuentemente, pero aparentemente no está presente en todos los quistes. 3,600 X.

5) Las pruebas de viabilidad dieron como resultado que a los 3 días después de que los quistes fueron colocados en el medio de crecimiento - TP-S-1 abundantes trofozoítos fueron observados y una nueva población fué formada a partir de los mismos.

Ante las evidencias anteriores se puede concluir que las formas quísticas obtenidas mediante la metodología descrita son quistes maduros y además viables.

Aún cuando los efectos del CO_2 observados fueron reproducibles, éstos podrían deberse a la presencia de otros gases contaminantes en el CO_2 empleado, o bien no directamente a la presencia del CO_2 sino a efectos colaterales de este gas como por ejemplo a una variación en el potencial de óxido-reducción en los cultivos inducida por la alta tensión de CO_2 empleada.

Efecto del CO_2 de alta pureza.

Para descartar si las impurezas presentes en el CO_2 pudieron ser la causa del efecto inductor del enquistamiento, el método descrito fué repetido utilizando CO_2 de alta pureza, el resultado fué semejante al obtenido con el CO_2 de No-alta pureza (CO_2 industrial) que se empleó en la mayor parte de los experimentos.

Variación en el Potencial de Oxido-Reducción:

Con respecto al cambio en el potencial de óxido-reducción por efecto del gaseo con CO_2 las mediciones promedio de 3 valores mostraron las siguientes lecturas.

TP + S	+	CO_2	(-)	=	182 mV
TP + S	+	CO_2	(+)	=	<u>150 mV</u>
			Diferencia		32 mV

Los valores prácticamente no variaron con respecto a los obtenidos con el testigo, puesto que el mismo dió variaciones en el mismo rango que los obtenidos con las muestras en las distintas mediciones que se hicieron. -- Dado que el mismo blanco dió variaciones que oscilaron alrededor de 40 mV al preparar diferentes estándares, se consideró que la variación de 32 mV no era significativa.

Diferencias en la osmolaridad:

También se investigó si había diferencias importantes en la osmolaridad de los medios empleados para investigar el efecto del CO_2 en combinación con la presencia o ausencia de glucosa.

La osmolaridad de los diferentes medios empleados fué medida, obteniéndose los valores siguientes.

TP-S-1	+ CO_2	383 mOs/Kg.
TP-S-1	(sin glucosa)+ CO_2	365 mOs/Kg.
AEM		78 mOs/Kg.

lo que muestra una variación mínima en la osmolaridad entre el medio TP-S-1 en presencia y ausencia de CO_2 .

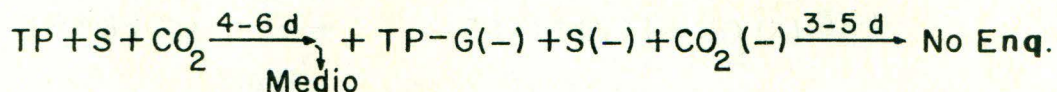
Variantes en el medio de enquistamiento:

Con el objeto de investigar si el efecto de alta tensión de CO_2 se requería sobre todas las fases del crecimiento de los cultivos para producir un enquistamiento eficiente o solo durante el crecimiento vegetativo o únicamente durante la inducción del enquistamiento y también si la combinación de ayuno de glucosa más alta tensión de CO_2 se requería para un óptimo enquistamiento se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

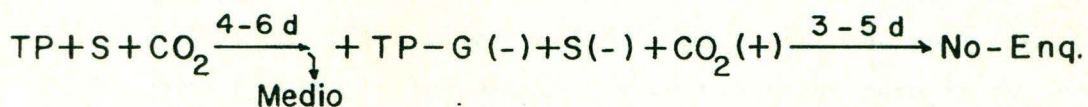
- 1) Para probar si para inducir enquistamiento era necesario el crecimiento previo con CO_2 en medio completo antes de colocar los trofozoítos en condiciones de enquistamiento (2a. fase del método), éstos se colocaron directamente en condiciones de enquistamiento a partir del medio de crecimiento normal resultando en la muy escasa presencia de quistes a los 3-5 días, con un mayor, pero aún escaso número de quistes a los 6-8 días.

$$\frac{\text{Inóculo} + \text{TP-G (-)} + \text{S} + \text{CO}_2 (+)}{\text{(del medio normal de crecimiento)}} \longrightarrow \text{Enquistamiento muy escaso}$$

- 2) Se probó el ayuno de glucosa como único requisito para la inducción - del enquistamiento al eliminar el suero y el CO_2 de las condiciones de enquistamiento (2a. fase del método). El resultado fué la ausencia de enquistamiento.

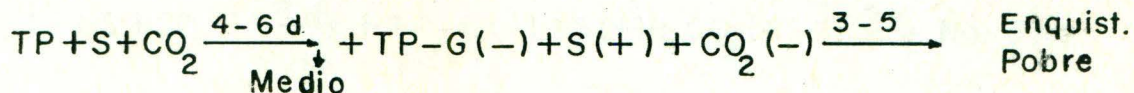


- 3) Ante este resultado se probó la necesidad de la presencia de suero colocando las condiciones de enquistamiento con ausencia de suero y ayuno de glucosa pero con CO_2 . El resultado fué la ausencia de enquistamiento:



$$\xrightarrow{3-5 \text{ d}} \text{No-Enq.}$$

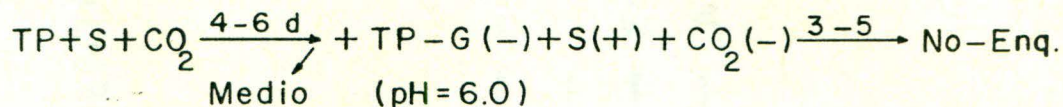
- 4) Asimismo, la ausencia de CO_2 además del ayuno de glucosa pero en pre-sencia de suero, no produjo enquistamiento:



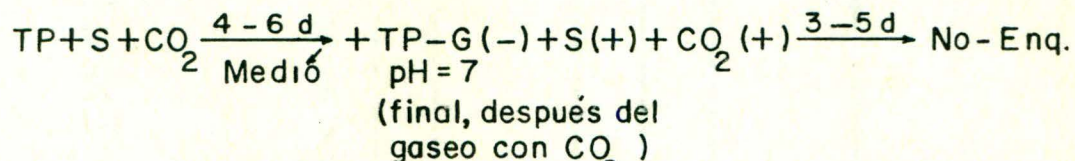
Este ensayo y el anterior indican la necesidad de suero y de CO_2 .

- 5) Por otra parte, cuando el medio es gaseado con CO_2 , el pH del medio - cambia de pH 7, a pH 6.0-6.1, es decir, aproximadamente una unidad. Para descartar si el enquistamiento es inducido por el nuevo pH más - que por el CO_2 , se preparó TP-G(-) ajustado a pH 6.0 y fué utilizado en la segunda fase del método (condiciones de enquistamiento) pero no fué gaseado. Así, las células fueron colocadas al pH producido por -

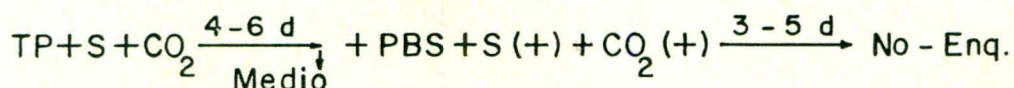
el gaseo con el CO_2 pero en ausencia de éste. El resultado fué la -- ausencia de enquistamiento, lo que indica que el cambio del pH producido por el CO_2 , no tiene efecto por sí mismo en la inducción del enquistamiento:



- 6) Por otra parte, para probar el efecto de la presencia de CO_2 sin el -- cambio de pH producido por éste, y ver si para la inducción del enquistamiento se requieren tanto el CO_2 como el pH 6, para las condiciones de enquistamiento se preparó TP a pH 8, para que al gasear con CO_2 el pH tomara un valor de aproximadamente 7 (ya que el PK_2 del ácido fosfórico es 6.8, casi 7, los meq. del HCO_3^- para pasar de pH 7 a pH 6 de ben ser aproximadamente los mismos que se requieren para ir de pH 8 -- a pH 7), y tener así un sistema gaseado con CO_2 pero a pH 7.0. El re-- sultado fué un nulo enquistamiento, lo cual indica que el pH 6 se re-- quiere para la inducción del enquistamiento, además del CO_2 :



- 7) Para probar si el TP fuera necesario para la inducción del enquista-- miento, en las condiciones de enquistamiento fué substituído el TP -- por PBS, en presencia de suero y CO_2 . El resultado fué un nulo enquis-- tamiento, lo que indica la necesidad del TP para la inducción del -- mismo.



Las variantes anteriores son resumidas en el Cuadro II.

CUADRO I

VARIANTES EN EL METODO DE ENQUISTAMIENTO

	1a. Fase (Excepto Variante No. 1)	Eliminación del primer medio	2a. Fase (Condiciones de Enquistamiento)	Resultado
METODO ⇒	TP + S + CO ₂ → ^{4-6 d}	↓	TP - G(-) + S(+) + CO ₂ (+) → ^{3-5 d}	60 - 85 %
VARIANTES {	2	" →	TP - G(-) + S(-) + CO ₂ (-) →	No - Enq.
	3	" →	TP - G(-) + S(-) + CO ₂ (+) →	"
	4	" →	TP - G(-) + S(+) + CO ₂ (-) →	Enq. pobre
	5	" →	TP - G(-) + S(+) + CO ₂ (-) →	No - Enq.
	6	" →	(pH = 6.0) TP - G(-) + S(+) + CO (+) →	"
			(pH = 7.0) (Final, después del CO ₂)	
	7	" →	PBS + S (+) + CO (+) →	"
	I	TP - G(-) + S(+) + CO (+) →	Enq. pobre

Con el objeto de investigar si los resultados descritos arriba estaban relacionados con las características de un solo lote de suero, se investigó el comportamiento de diferentes lotes de suero.

8) Al probar suero de diferentes orígenes en los resultados del método de enquistamiento se realizó el siguiente experimento:

Se sembraron 16 tubos en las siguientes condiciones:

Condición	# de tubos	1era. Fase	Condición*	2a. Fase	Resultado (a 90 h)
I	4	TP-G(+) + S ₁ + CO ₂ (-)	1	TP-G(-) + S ₁ + CO ₂ (-)	5 %
			2	TP-G(-) + S ₁ + CO ₂ (+)	5-10 %
II	4	TP-G(+) + S ₁ + CO ₂ (+)	1	TP-G(-) + S ₁ + CO ₂ (-)	10-15%
			2	TP-G(-) + S ₁ + CO ₂ (+)	40-50 %
III	4	TP-G(+) + S ₂ + CO ₂ (-)	1	TP-G(-) + S ₂ + CO ₂ (-)	5-10 %
			2	TP-G(-) + S ₂ + CO ₂ (+)	5-10 %
IV	4	TP-G(+) + S ₂ + CO ₂ (+)	1	TP-G(-) + S ₂ + CO ₂ (-)	10-15 %
			2	TP-G(-) + S ₂ + CO ₂ (+)	40-50 %

*Las células de dos tubos de cada una de las condiciones I a IV se colectaron en un solo tubo para aumentar el inóculo y tener 1 tubo de cada una de las condiciones (1) y (2).

Los resultados obtenidos indican que no hubo diferencia entre los dos sueros probados. Además de esto fueron utilizados dos sueros más de diferentes orígenes para probar el método de enquistamiento (condición II-(2) o IV-(2) dando también resultados positivos.

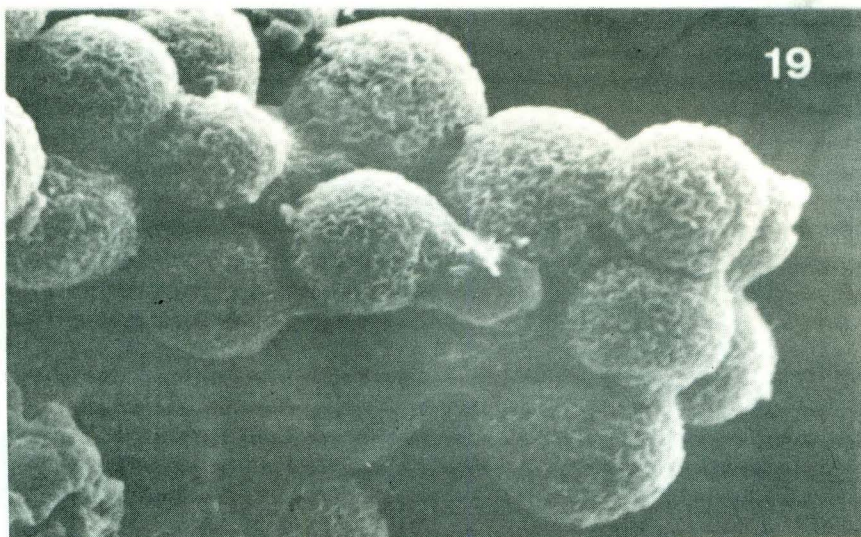


Fig. 19 Agregado de quistes de *E. invadens* obtenidos por alta tensión de CO_2 y ayuno de glucosa y observado por microscopía de barrido. Puede observarse el desenquistamiento de uno de los quistes. El trofozoíto deja la pared del quiste a través de un poro de la misma. 2,000 X.



Fig. 20 Corte semifino de quistes de *E. invadens* obtenidos por alta tensión de CO_2 y ayuno de glucosa. Nótese que en las células indicadas con flechas se distingue claramente una polarización de la estructura del quiste; en un polo se localiza el cúmulo de vacuolas y en el polo opuesto el núcleo y los cuerpos cromatoides. 1,250 X.

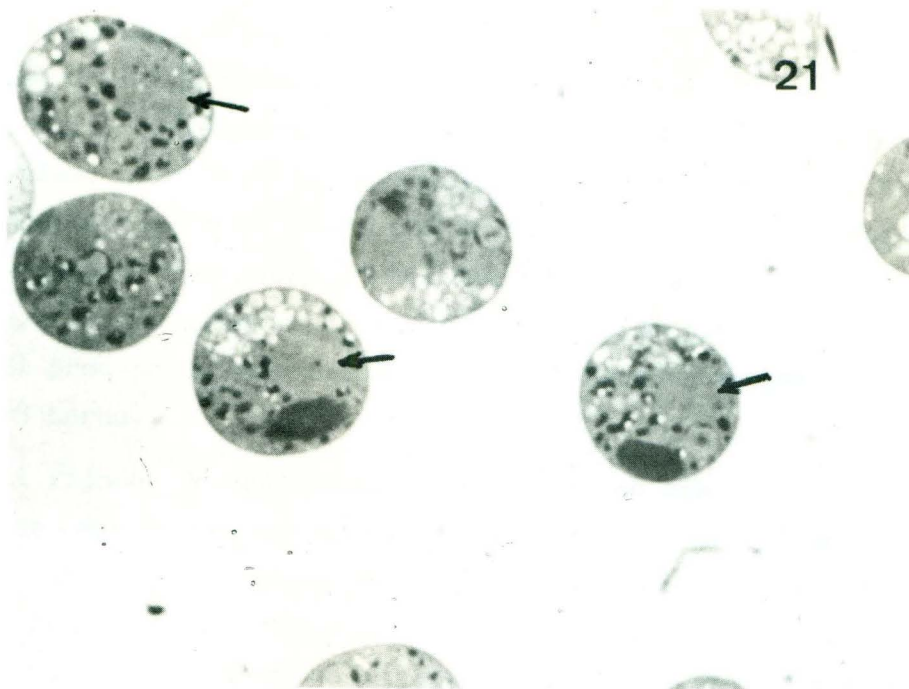


Fig. 21 Corte semifino de quistes de *Entamoeba invadens* obtenidos con - alta tensión de CO_2 y ayuno de glucosa. Nótese en el citoplasma de los - quistes una zona donde no existen vacuolas ni cuerpos cromatoides (flechas). Esta zona podría ser una inclusión, ya que al microscopio electrónico tiene una apariencia distinta al resto del citoplasma (véase figura 3). 1,250 X.

C. MORFOGENESIS DE LA PARED CELULAR DEL QUISTE DE *Entamoeba invadens*

Evolución de las células en AEM

La respuesta de los trofozoítos que son transferidos al medio de enquistamiento se caracteriza por un redondeamiento inmediato de una gran proporción de células, seguido de vacuolización citoplasmática, luego las células vuelven a adoptar la forma típica del trofozoíto y posteriormente, como -- primera manifestación del enquistamiento, las células se redondean nuevamente, aunque con un diámetro inferior al producido por el choque osmótico inicial. El proceso de diferenciación se completa en un período de aproximadamente 48 horas.

Respuesta al fijador de células con pocas horas en AEM

Cuando las células con dos horas después de haber sido inoculadas en AEM fueron tratadas con glutaraldehído, se observó invariablemente un arrugamiento de la membrana celular de los trofozoítos después del contacto con el fijador (Fig. 22). Sin embargo, al fijar células con ocho o más horas en AEM no se observó tal respuesta y las células fueron fijadas aparentemente manteniendo su forma intacta.

El enquistamiento es asincrónico

El proceso de diferenciación en *Entamoeba invadens* es un fenómeno asincrónico que se puso de manifiesto al observar las células fijadas a los -- distintos tiempos establecidos, en los cuales se detectó la presencia de -- células en diferente estadio de diferenciación aún en un mismo tiempo.

Analizando tiempos secuenciales durante el enquistamiento en AEM se pudo establecer una serie de eventos sucesivos por la aparición de nuevos estadios de diferenciación en cada nuevo tiempo analizado.

Durante el enquistamiento con alta tensión de CO₂, se puso también de -- manifiesto la asincronía del enquistamiento al presentarse células en distintos estados de desarrollo de la pared, pero fué también evidente sobre la superficie, la presencia de estructuras como los cordones o pliegues observados cuando se empleó el medio AEM (Fig. 23). Asimismo, el aspecto fi

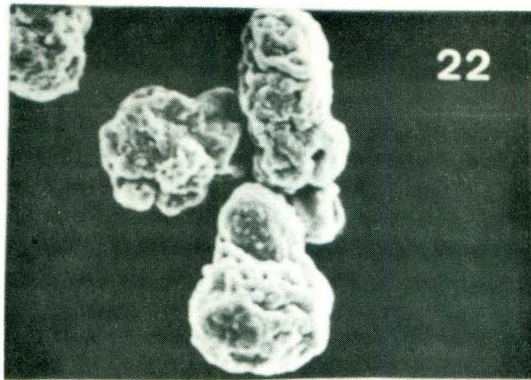


Fig. 22 Trofozoítos de *Entamoeba invadens* fijados con glutaraldehído y -
observados con microscopía de barrido dos horas después de haber sido co-
locados en AEM. La respuesta de las células fué invariablemente de un --
arrugamiento de la membrana. Este fenómeno no se observó con tiempos de -
8 horas o más en AEM. 1,800 X.

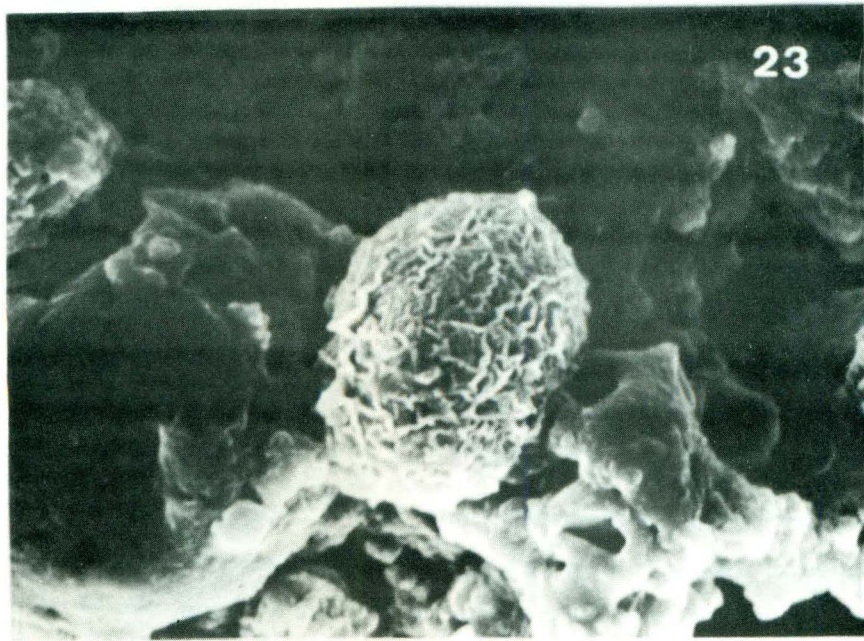


Fig. 23 Trofozoítos de *E. invadens* con 60 horas en la segunda fase del -
método de enquistamiento con alta tensión de CO_2 y ayuno de glucosa obser-
vados con microscopía de barrido. La formación de estructuras como cordo-
nes (o pliegues) sobre la superficie celular son iguales a los formados en
trofozoítos en proceso de enquistamiento en AEM (véanse figuras 26 y 27) -
y representan la primera manifestación visual de la formación de la pared.
4,800 X.

nal del quiste fué igual que el observado en el medio AEM (Figs. 16-A y - 16-B).

Secuencia de cambios morfológicos en la superficie celular que conducen a la formación de la pared del quiste (AEM)

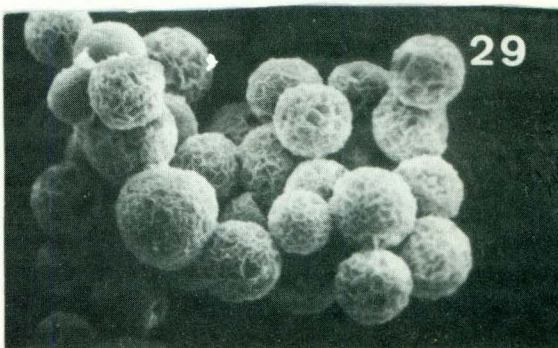
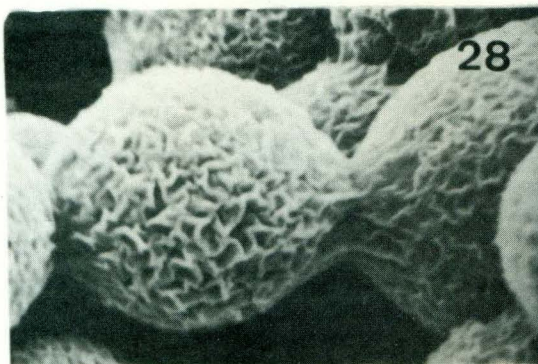
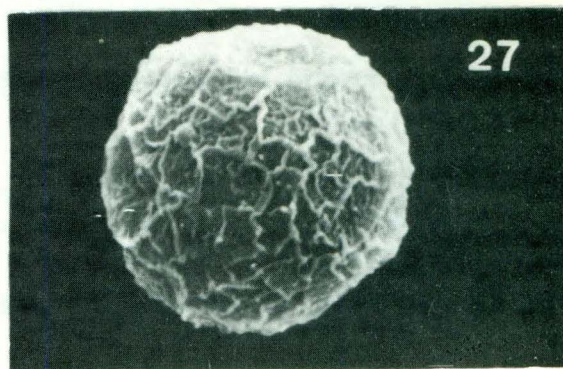
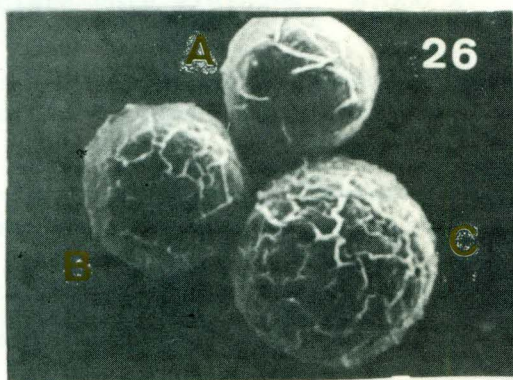
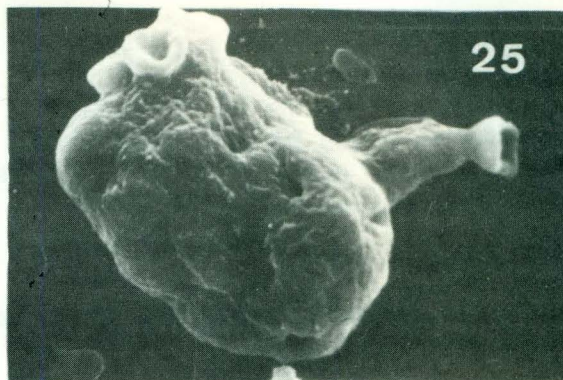
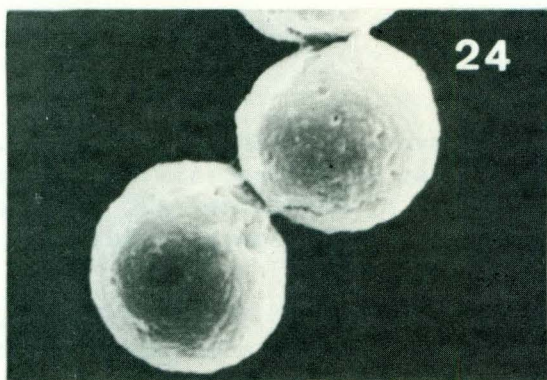
El examen de los distintos tiempos analizados demostró la presencia de diferentes estadios o aspectos de la superficie celular en diferentes células de un mismo tiempo. Sin embargo, mediante el análisis a tiempos sucesivos durante el enquistamiento, se pudo concluir la posible secuencia de los cambios que ocurren en la superficie celular durante el proceso de diferenciación, los cuales se describen a continuación: La manifestación -- inicial del enquistamiento se caracteriza por el redondeamiento de las células y una tendencia a agruparse entre sí (Fig. 24), en estas células la textura de la membrana es todavía semejante a la de los trofozoítos en medio de crecimiento (compárese con la figura 25). En este estadio inicial (después de 8 horas en AEM) la membrana celular ya no responde al fijador con el arrugamiento mostrado en la figura 22.

Después del redondeamiento inicial, el primer cambio que se aprecia sobre la membrana celular es la aparición de cordones, presumiblemente de -- quitina, que van apareciendo gradualmente en forma anastomosada sobre la -- superficie, quedando espacios en los cuales la membrana es aún semejante a la de los trofozoítos (Fig. 26, células A y B), sin embargo, estos espacios van siendo cubiertos paulatinamente por la aparición subsecuente de nuevos cordones más finos (Fig. 26 célula C y Fig. 27).

A medida que avanza el proceso de enquistamiento, los cordones se engrosan y crecen en altura hasta formar el quiste maduro. El estado final del quiste a las 48 horas en AEM denota paredes celulares ya formadas. La superficie de la pared del quiste presenta un aspecto plegado e irregular, -- ésto es evidente en la figura 28.

Agrupamiento entre quistes

Normalmente las células tienden a agruparse en la fase inicial del en-- quistamiento (Fig. 24) y así continúan hasta finalizar la diferenciación, permaneciendo unidas y originando agrupamientos que no se dispersan fácilmente luego de someterlos a una ligera agitación en el medio de enquista-



PIES DE FIGURAS 24-29

Fig. 24 Trofozoítos de *E. invadens* con aproximadamente 16 horas en AEM observados con microscopía de barrido. Las células redondeadas tienden a agruparse. La textura de la superficie celular es todavía semejante a la del trofozoíto (compárese con la figura 25). 4,800 X.

Fig. 25 Trofozoíto de *E. invadens* en medio de crecimiento observado por microscopía de barrido. 3,600 X.

Fig. 26 Trofozoítos de *E. invadens* en medio AEM observados con microscopía de barrido. Las células A, B y C representan respectivamente estados más avanzados en la formación de la pared. Cordones (o pliegues) de la pared son claramente visibles. 4,000 X.

Fig. 27 Trofozoíto en estado avanzado de diferenciación observado por microscopía de barrido. 5,400 X.

Fig. 28 Quistes de *E. invadens* formados en AEM, observados por microscopía de barrido. Nótese la continuidad de la pared entre quistes. 4,000 X.

Fig. 29 Agregado de quistes de *E. invadens* formado en AEM y observado por microscopía de barrido. 1,600 X.

miento (Fig. 29). Cabe resaltar que las células agrupadas en la fase inicial del proceso sí se separan luego de agitar el medio.

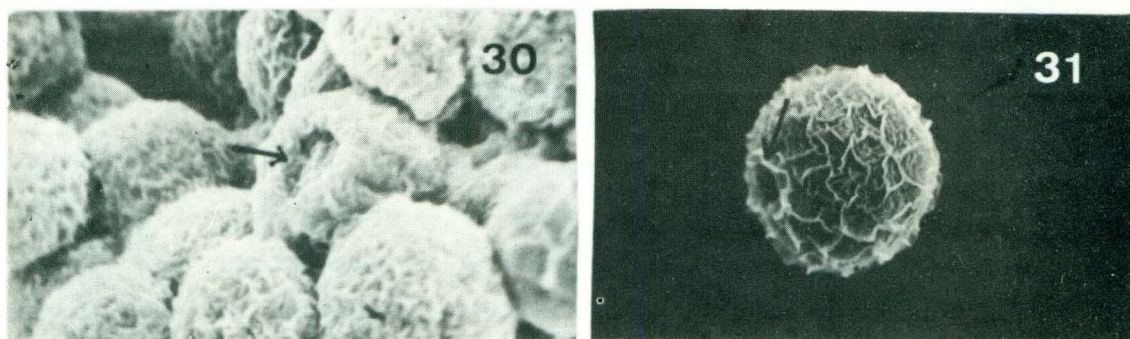
La fuerte cohesión entre las células de estos agregados aparentemente es debida a una continuidad de la pared celular entre células vecinas - - (Fig. 28) que es lo que permite que los quistes se mantengan agregados aún después de agitación suave del medio. Este fenómeno fué también observado en los agregados de quistes inducidos por alta tensión de CO_2 .

Presencia de depresiones en la pared celular

En los estados de quiste o prequiste aparecen usualmente depresiones o cavidades sobre la superficie celular (Figs. 30 y 31). En estos sitios, la pared es posiblemente más delgada que en el resto de la misma. Este fenómeno no fué también observado en quistes inducidos con alta tensión de CO_2 - - (véase figura 18).

Evidencia de una película primordial que rodea a la célula

En los quistes formados en AEM, algunas estructuras fueron observadas - presentando una película delgada cubriendo al trofozoíto, el cual se observó liso y con un volumen reducido (Fig. 32). La película se pone de manifiesto por existir un rompimiento en su superficie. Estas estructuras fueron escasas en las observaciones.



Figs. 30 y 31 Formas quísticas observadas por microscopía de barrido donde se puede apreciar las depresiones o cavidades (flechas) en la pared de quistes de *E. invadens* formados en AEM. Fig. 31, 4,800 X. Fig. 32 4,000 X.

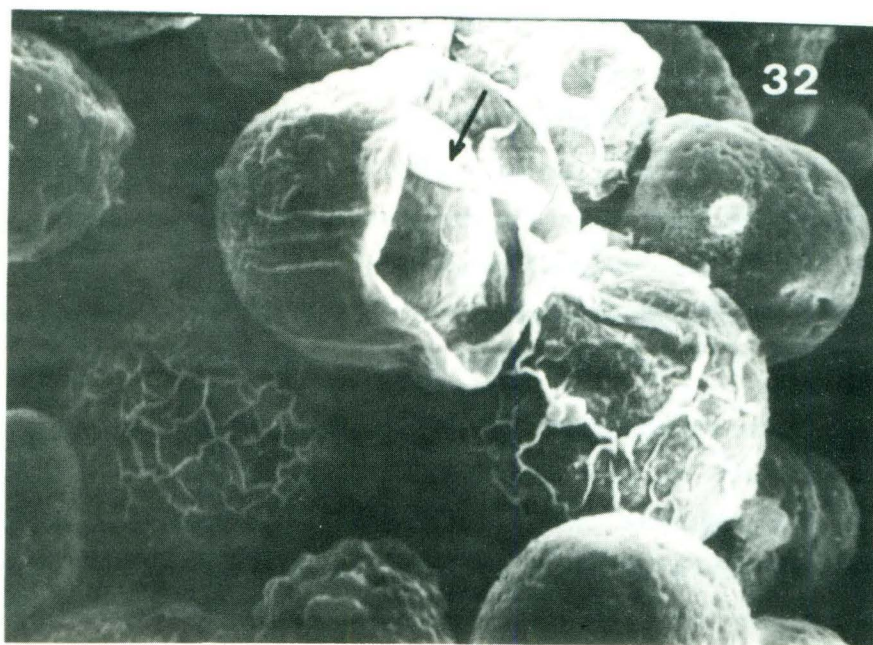


Fig. 32 Micrografía de barrido donde se muestra la presencia de trofozoítos con 30 horas en AEM. En una de las células es evidente la presencia de una película rota (flecha) que rodea a la célula. En dos de las células vecinas se antoja pensar que las estructuras como cordones observados en la superficie podrían ser más bien pliegues de esta película.

D I S C U S I O N

1020091653

El crecimiento de *E. invadens* en medio TP-S-1 normal y con alta tensión de CO₂, mostró gran semejanza en las cinéticas respectivas, siendo ambas lineales, sin fase de adaptación, con un tiempo de duplicación de aproximadamente 24 h y un rendimiento máximo de 4×10^5 cel/ml. Estos resultados muestran que el patrón de crecimiento es básicamente el mismo independientemente de que su crecimiento se efectúe con alta tensión o con tensión normal de CO₂.

Por otra parte, ya que de acuerdo a Kusamrarn y col. (1975a; 1975b) los cuerpos cromatoides son inducidos únicamente cuando existen ribosomas libres por inhibición de la síntesis de proteínas, resulta hasta cierto punto sorprendente la presencia de hélices ribonucleoprotéicas y cuerpos cromatoides en células que crecen activamente y a la misma velocidad que el testigo. Puesto que un crecimiento normal implica que la dotación o poza de ribosomas metabólicamente activos es normal, la presencia de hélices y de cuerpos cromatoides desde el segundo y tercer días en células creciendo activamente supone un exceso de ribosomas totales, exceso que aparentemente es destinado a la formación de hélices ribonucleoprotéicas y estas posteriormente a la integración de cuerpos cromatoides.

Esta supuesta sobreproducción de ribosomas inducida por alta tensión de CO₂ en el medio de cultivo, implica que debe existir una actividad de síntesis ribosomal mayor que en los testigos. La "sobreproducción" de RNA ribosomal (rRNA) es un fenómeno ya conocido en otros sistemas de diferenciación como en *Xenopus* (De Robertis y De Robertis, 1980) donde ocurre por aumento específico del número de genes ribosomales, proceso conocido como amplificación génica. En *Xenopus*, la manifestación morfológica de la amplificación génica es la presencia de un número muy grande de nucléolos - - - (600 a 1000 nucléolos por núcleo); coincidentemente, al primer día de cultivo de *E. invadens* con alta tensión de CO₂ los núcleos de gran número de trofozoítos muestran numerosas estructuras semejantes a nucléolos originados aparentemente por un aumento y condensación en unidades separadas de la cromatina periférica. Al respecto, existe evidencia de que tal cromati

na periférica tiene una función nucleolar, Albach y col. (1977, 1980). -- Estos autores basados en resultados de experimentos de autoradiografía y cinéticas de enquistamiento-crecimiento han postulado que la mayoría del RNA localizado periféricamente es rRNA y precursores de este mismo tipo de RNA, y que las pequeñas cantidad de DNA encontradas en la cromatina periférica corresponde a rDNA. Si esto es así, la cromatina periférica podría -- ser funcionalmente comparable a un nucléolo de eucariotes. Además, mate-- rial nucleolar localizado periféricamente ha sido también descrito en -- **Amoeba proteus** (Roth y col. 1960).

Los antecedentes sobre la presencia de agregados de ribosomas en forma de diversas estructuras en distintos grupos de organismos tales como en el embrión de **Rana pipiens** (Waddington y Perry, 1963). embrión de pollo en -- hipotermia (Morimoto y col. 1972), Oocytos de lagartijo (De Robertis y -- De Robertis, 1980) en el núcleo de células enquistadas de **Acrasis rosea** -- (Olive, 1975) e intestino delgado de feto de rata (Behnke, 1975) apoyan -- fuertemente la idea, ya mencionada en antecedentes, de que las hélices ri-- bosomales y cuerpos cromatoides no son solamente un evento sin significado biológico, sino más bien un mecanismo estratégico de acumulación de ribosomas previo a (o asociado a) un inminente enquistamiento, para su utiliza-- ción en una rápida proliferación celular en la subsiguiente germinación -- del quiste, aunque este proceso pueda también ser artificialmente inducido por inhibición de la síntesis de proteínas. Esto último explicable por la aparente capacidad innata de agregación de los ribosomas no asociados a polisomas.

Si la formación de hélices ribonucleoprotéicas y cuerpos cromatoides, -- presentes invariablemente durante el enquistamiento, forman parte normal, como así parece, de tal proceso, la inducción de tales estructuras sin la formación de pared, implica que ciertos eventos que se llevan a cabo en paralelo durante el enquistamiento, pueden ser inducidos independientemente uno de otro si los trofozoítos son sometidos a ciertos factores o condiciones del medio. Así, la alta tensión de CO₂, induce formación de cuerpos -- cromatoides, pero no la formación de pared, evento que evidentemente debe

mo, Singh y col. (1974) propusieron que el papel de L-cisteína en el crecimiento de *E. histolytica* fué la producción de bajo potencial de óxido-reducción. Sin embargo, Band y Cirrito (1979) demostraron que la L-cisteína fué necesaria aún bajo condiciones rigurosamente anaeróbicas. Estos resultados indican que son las sustancias mismas que producen el cambio en el potencial de óxido-reducción lo que induce el efecto, más que el cambio -- mismo del potencial redox.

Dos factores que algunos autores han considerado de alguna manera como inductores del enquistamiento: el potencial de óxido-reducción y el choque osmótico, no son factores claves para el método aquí descrito y aparentemente solo se requiere de un previo crecimiento con alta tensión de CO_2 en el medio por 4-6 días, ya que cuando se ensayó la fase de enquistamiento -- (segunda fase del método) sin la previa incubación con CO_2 en medio completo (primera fase del método) no hubo diferenciación o fué pobre (variante 1, Cuadro II de Resultados).

La alta tensión de CO_2 y ayuno de glucosa, pero en ausencia de suero no indujeron diferenciación, lo que indica que la presencia de suero fué necesaria para la inducción del enquistamiento (variante 3, Cuadro II). Pero asimismo, la carencia de enquistamiento en ausencia de CO_2 aún con ayuno de glucosa y presencia de suero indican que el CO_2 fué también necesario -- (variante 4, Cuadro II).

Por otra parte, cuando los trofozoítos fueron crecidos a pH 6 (el pH -- producido por el gaseo con CO_2), pero en ausencia de CO_2 , no se produjo enquistamiento, indicando que tal pH ácido no tiene por sí mismo efecto en -- la inducción del enquistamiento (Variante 5 Cuadro II), pero el enquistamiento estuvo también ausente cuando la incubación de la segunda fase del método se hizo con TP-G(-) pero a un pH final de 7 (variante 6 Cuadro II). Este último resultado indica que además del CO_2 , el pH ácido es necesario para inducir enquistamiento. Por otra parte, ya que al sustituir el TP -- por PBS en la fase de enquistamiento éste no se produjo (variante 7 Cuadro II), indica que el TP fué también necesario.

En base a los resultados obtenidos en las variantes del método se puede concluir que debe existir la conjugación de varios factores para inducir el disparo del proceso de diferenciación. Estos serían, por lo menos: --

a) un previo crecimiento con alta tensión de CO_2 , b) ayuno de glucosa, -
c) suero, d) alta tensión de CO_2 , e) pH 6 y f) TP. Aunque debe estable--
cerse claramente que estas condiciones están dadas para la metodología - -
aquí descrita, pero son diferentes cuando se utilizan otras metodologías -
(Das y col. (1980), Mirelman y Auron (1988), Rengpien y Bailey (1975) y --
Vazquezdelara-Cisneros y Arroyo-Begovich (1984)).

El CO_2 induce formación de cuerpos cromatoides en TP-S-1 en la primera
fase del método y su presencia es también necesaria en la segunda fase con
ayuno de glucosa. El ayuno de esta última, a su vez, es aparentemente lo
que induce la síntesis de pared y posiblemente otros eventos. La condi- -
ción de pH 6 podría ser requisito para el desarrollo de algunos eventos --
bioquímicos no evidentes del proceso, y el suero y el TP como fuente de --
factores esenciales.

La necesidad de varios factores y condiciones simultáneos para inducir
enquistamiento, hace la posibilidad de que varios eventos bioquímicos invo-
lucrados en el proceso podrían ser simultánea o secuencialmente disparados
por factores diferentes. El hecho de que dos eventos que ocurren simultá-
neamente durante el enquistamiento en el medio AEM de Rengpien y Bailey --
(1975) puedan ser separados como dos eventos sucesivos independientes tales
como la formación de cuerpos cromatoides y la síntesis de pared apoya la -
idea de que el enquistamiento es inducido por la acción de dos o más facto-
res que inducen eventos bioquímicos independientes, aunque todos formando
parte de un proceso mayor, la diferenciación. Asimismo, es posible que -
algunos factores (o eventos que originan) no tengan que ser necesariamente
simultáneos, pero sí en una secuencia definida, es decir, no podría ser --
primero la síntesis de pared (originado por la falta de glucosa) y después
la formación de cuerpos cromatoides, la secuencia debe ser el revés o, - -
cuando menos simultánea, como aparentemente ocurre en el medio AEM. Algu-
nos eventos implicados en la diferenciación son dependientes uno del otro,
como podría ser la síntesis de pared de la degradación de glucógeno, pero
otros deben ser independientes entre sí, como la ya mencionada formación -
de cuerpos cromatoides que es independiente de la síntesis de pared; - - -
aunque no sabemos si la formación de ésta sea independiente de la forma- -
ción de cuerpos cromatoides.

De cualquier forma, la acción concertada de todos ellos va encaminada - hacia la formación de un quiste viable, donde la ausencia de alguno de los factores podría hacer "abortar" el proceso o producir un quiste no-viable (véase fig. 33).

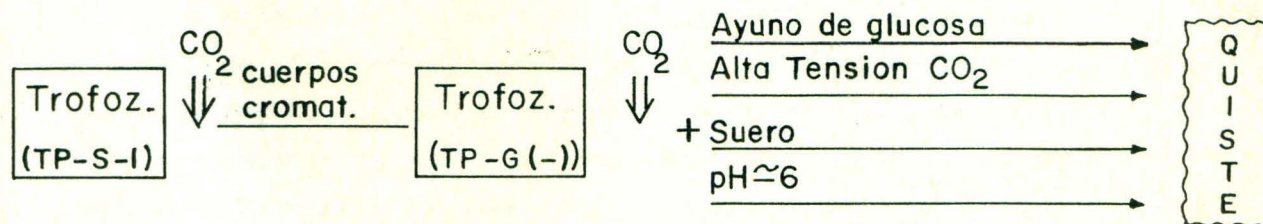


Fig. 33 Diferenciación en *E. invadens*. Según la metodología descrita se requieren varios factores para la formación de un quiste maduro y viable. La acción de un factor podría inducir uno o más eventos del enquistamiento. Algunos de estos eventos son independientes de otros, otros podrían ser interdependientes pero todos necesarios, de tal manera que la falta de un evento podría hacer abortar al proceso o producir un quiste no-viable.

La metodología aquí descrita para inducir enquistamiento en trofozoitos de *Entamoeba invadens* tiene la ventaja de que en ningún momento las células sufren cambios drásticos de algún factor, como sucede en el medio AEM comúnmente usado de Rengpien y Bailey (1975) en el que hay una diferencia de aproximadamente 300 mOs menos con respecto al TP-S-1. El medio AEM requiere también un período de maduración de un mes, además de que las células deben encontrarse en condición óptima de crecimiento (mitad de fase - log). Por otra parte, el método de inducción de enquistamiento en *E. invadens* descrito por Vazquezdelara-Cisneros y Arroyo-Begovich (1984) por eliminación de la glucosa del medio TYI-S-33 (Diamond, L.S. y col. 1978), requiere también células en óptimas condiciones de crecimiento. En ambos métodos células cerca de entrar a la fase estacionaria no producen resultados eficientes. Sin embargo, en el método aquí descrito la eficiencia se mantiene, aún partiendo de células entrando a la fase estacionaria. Este comportamiento puede explicarse por el hecho de que después del primer gaseo con CO₂ las células deben crecer de 4 a 5 días antes de ser colocadas en el medio sin glucosa y alta tensión de CO₂, tiempo en que las células pueden entrar de nuevo a una fase-log.

Por otra parte, es importante hacer notar que un muy alto porcentaje de los quistes obtenidos por este método con alta tensión de CO_2 presentan una morfología más bien ovoidea al contrario de lo que sucede con los quistes obtenidos con el medio AEM, los cuales son generalmente esféricos. Esta diferencia podría ser explicada por la baja osmolaridad del medio AEM y por el tiempo relativamente corto que va desde el inicio hasta el final de la formación de la pared (aprox. 20 horas). La forma ovoidea de los quistes inducidos por CO_2 se explica porque la mayoría de los trofozoítos posiblemente por encontrarse en un medio isotónicamente normal aparentemente tienden a continuar su movilidad y forma irregular aún cuando la síntesis de pared ya ha comenzado y esta movilidad es detenida hasta que la pared cubre su superficie, dando así una mayor probabilidad de tener al final una forma que se aparta más de la esférica, quedando más bien ovoidea.

El hecho de que los quistes de **Entamoeba** formados **in vivo** sean más bien ovoideos, que esféricos, nos permiten suponer que el enquistamiento inducido, por alta tensión de CO_2 es un procedimiento más parecido a lo que sucede **in vivo** que el procedimiento por choque osmótico.

La fotografía 19 de resultados muestra claramente como un trofozoíto -- deja la protección de la pared a través de una abertura en la misma. Esta observación apoya la interpretación de las observaciones de Cervantes-Mamoa y Martínez-Palomo (1980), y Snyder y Meleney (1941) en cuanto a que el trofozoíto deja la cubierta a través de un poro en la pared. Sin embargo, no sabemos todavía si la posición de estos poros de salida concuerdan con las cavidades en la pared observadas en algunos quistes, ya que, aunque es sugestivo que tal cosa suceda, como sucede en otras amibas, aparentemente no todos los quistes presentan tal cavidad.

La polaridad de las vacuolas del quiste, así como de los núcleos y cuerpos cromatoides indican una organización especial para los organelos del quiste y es posible que este arreglo especial tenga alguna función con relación al desenquistamiento o alguna relación con una posible zona específica para el poro de salida del trofozoíto .

Por otra parte la zona como una inclusión vista con alta frecuencia en quistes y también en algunas células después del primer día con alta ten--

sión de CO_2 posiblemente sea inducido por la presencia de este gas, ya que esta "estructura" no ha sido descrita en quistes formados en AEM ni en los obtenidos de organismos infectados, así como tampoco en trofozoítos crecidos con tensión normal de CO_2 .

Los inóculos para inducir enquistamiento en medio AEM fueron tomados a la mitad de la fase logarítmica en base a los trabajos de Rengpien y Bailey (1975) y Vazquezdelara y Arroyo Begovich (1984) en los que encuentran que la eficiencia de enquistamiento es mayor cuando los inóculos son tomados - aproximadamente en la parte media de la fase-log de la curva de crecimiento. Estos resultados fueron también confirmados en el laboratorio.

El hecho de que las células se vuelvan esféricas inmediatamente después de transferirlas del medio TP-S-1 al medio de enquistamiento se explica -- por la baja osmolaridad de éste último (70-80 mOsm) con respecto al primero (380-390 mOsm).

La respuesta al contacto con el fijador en las primeras horas de que -- las células han sido inoculadas en AEM puede ser consecuencia de una inestabilidad de la membrana celular originada por el choque osmótico recibido al transferirlas a este medio (Rengpien y Bailey, 1975; Bailey y Rengpien, 1980). Esta inestabilidad de la membrana aparentemente se mantiene por un período que va de 2 a 8 horas, ya que posteriormente las células resisten - el contacto con glutaraldehído y se comportan nuevamente como los trofozoítos en medio de crecimiento (TP-S-1), en el sentido de que, además de no - arrugarse, recuperan su forma típica pseudopodial y capacidad de crecimiento como paso previo a la iniciación de la formación del quiste.

La evolución de los cambios morfológicos de la superficie de la pared - desde la aparición de "cordones" anastomosados o plegamientos de una película superficial inicial (véase más adelante), la posterior saturación de la superficie por nuevos "cordones" (o pliegues), el crecimiento y engrosamiento de los mismos, el estado final del quiste con una superficie rugosa que se conserva después del tratamiento con HCl 0.1 N y NP-40 0.2 % y la posterior capacidad de desenquistarse en el medio TP-S-1 dan una fuerte evidencia de que las estructuras finales presentadas como quistes maduros, lo son realmente y que además son viables. Por lo tanto, la superficie -

observada debe representar la forma normal de la pared del quiste; asimismo, como esta pared se originó a partir del crecimiento de multitud de cordones (o pliegues) anastomosados en la superficie, consideramos que éstas estructuras están formadas de quitina, el componente mayor de la pared -- (Arroyo-Begovich y col. 1978, 1980).

Se ha encontrado que la quitina sintetasa de **Mucor rouxii** y -- -- -- -- -- **Saccharomyces cerevisiae** se encuentra asociada a membrana (Cabib y Farkas, 1971; Kang y col. 1984) y su función es probablemente extracelular (Kang y col. 1984) y que en el mismo **Mucor rouxii** la enzima forma fibras (cordones) de quitina y se halla asociada al extremo de crecimiento de las mismas -- -- (Bartnicki-García, 1963; Bartnicki-García, 1973; Ruiz Herrera y col. 1975). Bajo estos antecedentes, podemos pensar que la quitina sintetasa de -- -- -- **E. invadens** actúa extracelularmente, por lo cual, se puede suponer que la enzima opera sobre la superficie de la membrana; de esta manera puede explicarse la aparición de los cordones o la formación de la posible película -- primordial que forma los pliegues en la superficie celular durante la síntesis de la pared. Al ser secretados enzimas y precursores de pared, es -- necesario pensar que la enzima o algún oligómero precursor se deben hallar anclados de alguna manera en la membrana para evitar su difusión al medio.

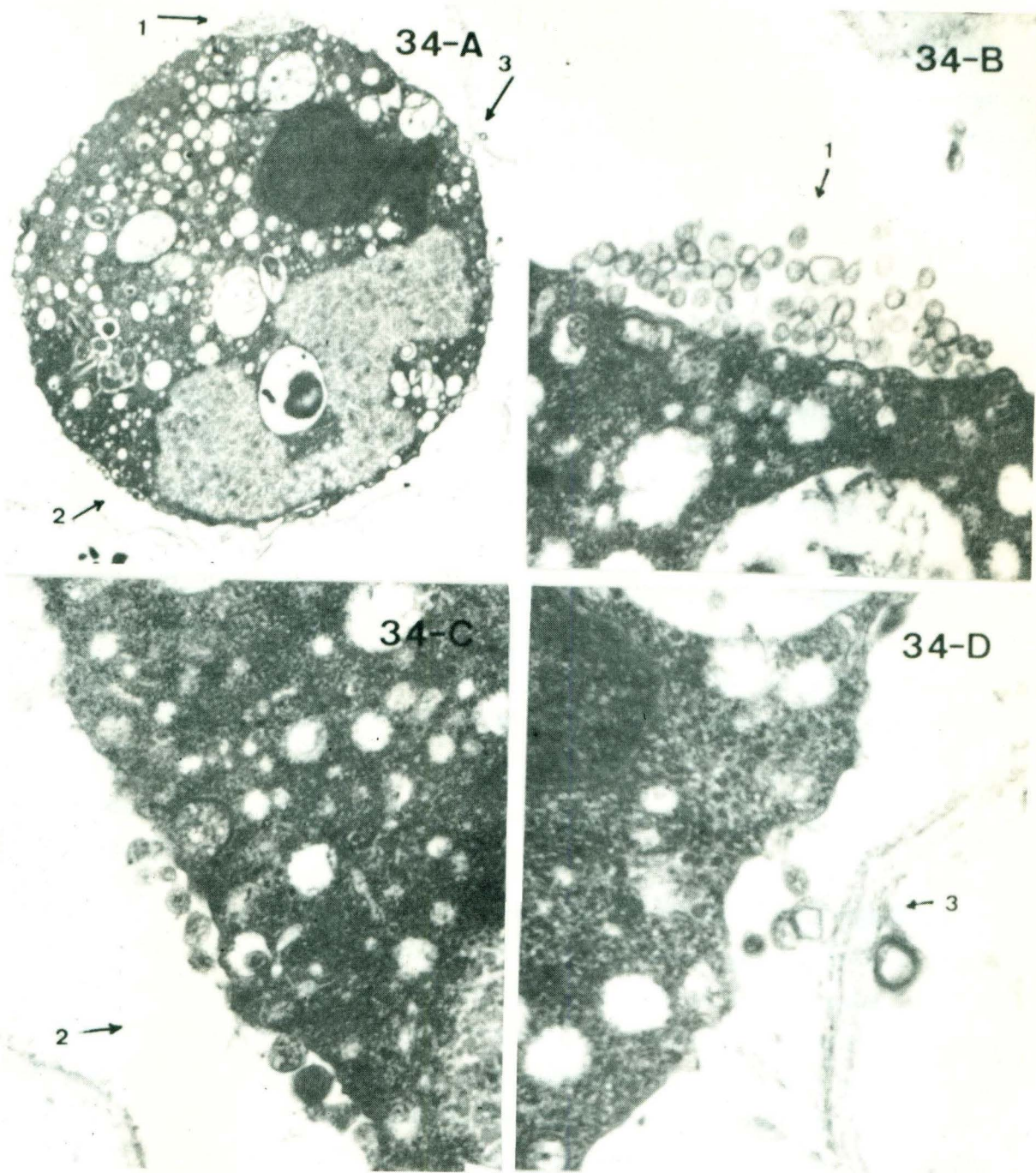
Por otra parte, la continuidad de la pared celular entre quistes vecinos no es un fenómeno exclusivo de **E. invadens**, pues ya ha sido reportado que en quistes de **Blepharisma stoltei** existe una prolongación de la pared entre células vecinas (Walsch e Isquith, 1979). La fusión entre paredes -- celulares de quistes de **E. invadens** explica la gran cohesión que existe -- entre ellos y que forman los agregados en los estados finales de su formación.

En base a las evidencias ya referidas sobre **M. rouxii** y **S. cerevisiae**, la fusión de paredes celulares entre células vecinas puede ser explicada -- mediante la siguiente hipótesis: la enzima se mueve sobre la superficie de la membrana y simultáneamente va formando fibras de quitina. El movimiento de la enzima podría continuar hasta que llega a hacer contacto con la -- membrana de una célula vecina íntimamente unida, y ya que son células de -- la misma especie, la enzima no desconoce la nueva superficie y continúa -- sintetizando quitina, permitiendo así una interacción más fuerte entre las

dos células a través de las fibras o cordones de quitina, los cuales posteriormente serán engrosados. Por otra parte, se ha postulado que los precursores de la pared se encuentran en pequeñas vacuolas localizadas muy cerca de la membrana celular (Chávez y col. 1978), observaciones que han sido comprobadas por nosotros (Fig. 34) lo que hace suponer, como ya se ha dicho, que serían vertidas por exocitosis, y ya que ambas células se encuentran en estados semejantes de diferenciación, el aporte de precursores para la síntesis de pared estaría presente en ambas membranas. Conviene señalar que el tamaño del quiste es aproximadamente de cinco a seis veces menor -- que el trofozoíto (véase figura 14-A), por lo tanto es posible que la activa acción exocítica mostrada en la figura 34 represente también un mecanismo de secreción de material citoplasmático que ayuda a reducir el volumen celular.

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, además de -- las referencias ya mencionadas (Cabib y Farkas, 1971 ; Chávez y col. 1978; Lasman, 1982; Ruiz Herrera y col. 1975), hemos especulado sobre una posible secuencia de eventos durante el desarrollo de la formación de la pared del quiste de *E. invadens* explicado a través de las siguientes etapas -- (véase también la figura 35):

Fig. 34(A-D) (hoja siguiente). La figura 34 (A) es una micrografía electrónica del corte de un trofozoíto de *E. invadens* con 90 horas con alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa (segunda fase del método de enquistamiento). En esta célula se aprecian varias regiones donde se observa una activa secreción de material celular (flechas), presumiblemente precursoras de pared -- y/o expulsión de material citoplasmático innecesario para la formación del quiste. Tal evidencia se observa más claramente en los recuadros B, C y D, los cuales son ampliaciones de los sitios señalados por las flechas, en los cuales se observan numerosas vesículas de secreción, muchas de las cuales contienen material con idéntico aspecto al que se observa en el citoplasma vecino, lo cual sugiere que durante el enquistamiento existe secreción de material citoplasmático, además de la secreción de precursores de la pared. (A) 4,400 X, (B) 38,000 X, (C) 38,000 X, (D) 50,000 X.



Pie de Figura Pág. 60

- | Etapa | Evento que sucede |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Redondeamiento del trofozoíto. Primera manifestación visual directa de la iniciación del enquistamiento (cabe señalar que algunas células inician la formación de la pared aún con forma como trofozoíto). |
| 2 | Células redondeadas. No hay cambios en la superficie celular. - Aparecen pequeñas vacuolas citoplasmáticas con precursores de la pared. |
| 3 | Células redondeadas. Aún no hay cambios evidentes en la superficie celular. Las vacuolas vierten por exocitosis los primeros precursores para la síntesis de pared. Se inicia la síntesis de pared. |
| 4 | Culmina la formación de una película delgada y flexible sobre la superficie celular. |
| 5 | Se inicia y concluye la reducción del volumen del trofozoíto y la película delgada y flexible se colapsa sobre la superficie del trofozoíto formando los primeros pliegues semejantes a cordones. -- Continúa la incorporación de precursores y engrosamiento de la pared. |
| 6 | Continúa la incorporación de precursores hasta que concluye la formación de pared. Quiste maduro. |

Por otra parte, ya que las células se asocian en agregados desde las primeras fases de la diferenciación, podría suponerse una posible fusión de las membranas celulares por debajo de la fusión de las paredes, pero -- ésta asociación entre células aparentemente no incluye la fusión de membranas puesto que en trabajos previos del laboratorio en los que se han revisado gran número de cortes de pastillas de quistes a través de microscopía electrónica y microscopía óptica nunca se ha encontrado tal evidencia -- (Morales-Vallarta y col. 1982).

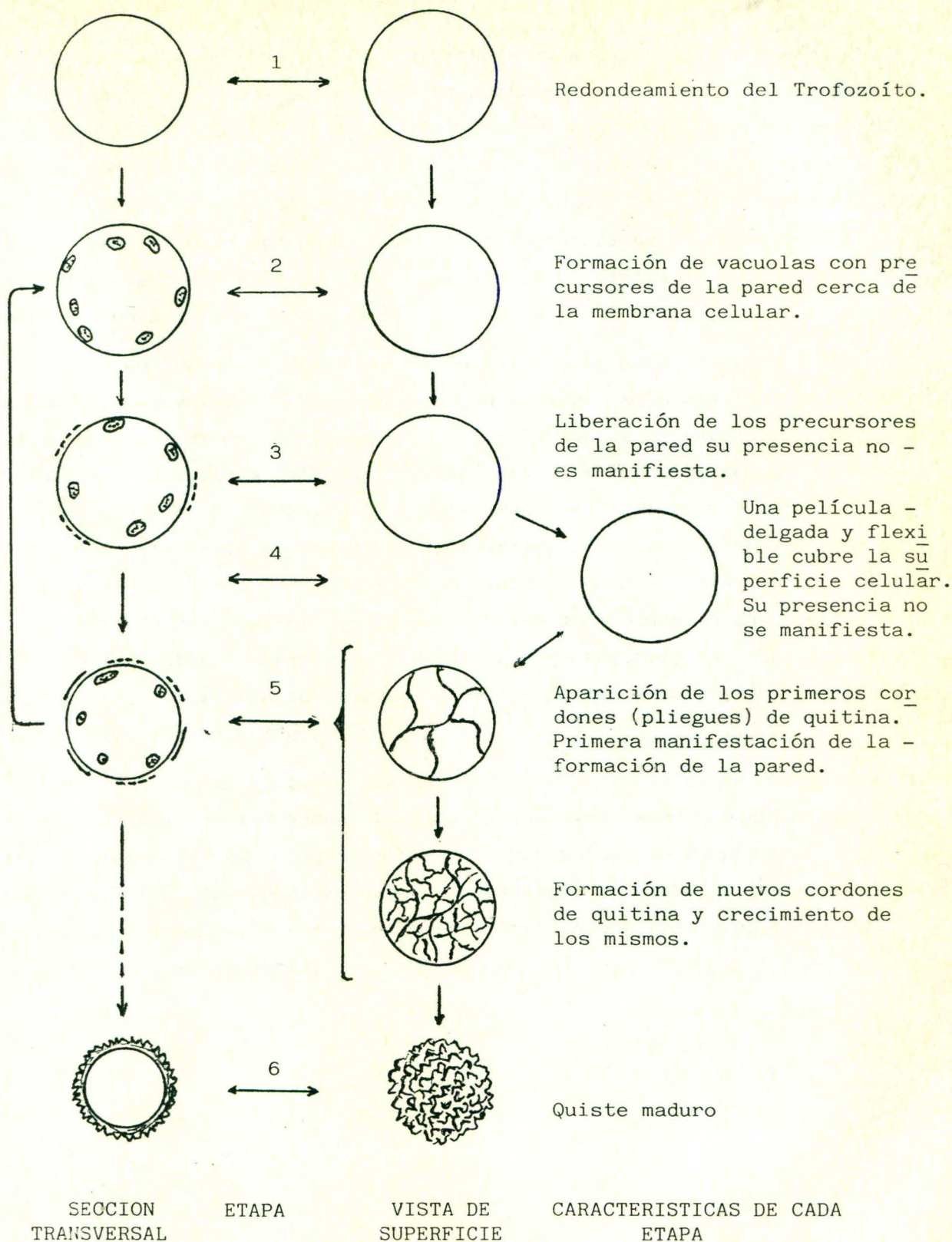


FIG. 35. MODELO DE LA POSIBLE SECUENCIA DE EVENTOS QUE OCURREN DURANTE LA FORMACION DE LA PARED CELULAR DEL QUISTE DE *Entamoeba invadens* IP-1.

La tendencia de las células a agruparse en grandes grumos desde las primeras fases de diferenciación probablemente sea consecuencia de la densidad de inóculo utilizado (Everitt, 1950), sin embargo este comportamiento permanece todavía sin explicación, aunque es necesario hacer notar que en los medios de crecimiento TP-S-1 y TYI-S-33 (Diamond y col. 1978) los trofozoítos crecen formando agregados, aunque más pequeños que los que se forman en AEM (Rengpien y Bailey, 1975), pero en estos medios de crecimiento las células nunca llegan a enquistarse.

En algunas especies de protozoarios, el quiste está provisto de un poro u opérculo de salida del trofozoíto, sin embargo, en otras no existe avenida de escape y se requiere, ya sea la disolución de la pared por acción enzimática o su ruptura (Manwell, 1968). Mediante estudios de cinematografía espaciada en *E. invadens* (Cervantes-Mamoa y Martínez y Palomo, 1980) y de desenquistamiento en *Endamoeba histolytica* (Snyder y Meleney, 1941) se ha descrito que la emergencia del trofozoíto ocurre a través de un poro en la superficie de la pared cuando los quistes son colocados en un medio de cultivo favorable al crecimiento. En otros protozoarios se han observado también opérculos para la emergencia de las formas vegetativas (Lasman, 1977, 1982; Walsch e Isquit, 1979).

Estas evidencias sugieren que las depresiones o cavidades en la pared de quistes de *Entamoeba invadens* IP-1 cultivada axénicamente podrían representar futuros poros de emergencia para el trofozoíto, de manera semejante a como ocurre en otros protozoarios, sin embargo, el hecho de que aparentemente la cavidad de la pared no se encuentra en una gran proporción de quistes dá incertidumbre a tal hecho.

CONCLUSIONES

- 1 Los cuerpos cromatoides son inducidos en fase activa de crecimiento -- (fase-log) de trofozoítos de **Entamoeba invadens** crecidos axénicamente con alta tensión de CO₂.
- 2 Se ha desarrollado un nuevo método de enquistamiento axénico de -- -- -- **Entamoeba invadens** inducido por alta tensión de CO₂ y ayuno de glucosa.
- 3 La estructura del quiste de **Entamoeba invadens** es polarizada: presenta un hemisferio vacuolar y uno nuclear donde también se localizan los -- cuerpos cromatoides.

P E R S P E C T I V A S

La inducción de cuerpos cromatoides en trofozoítos de *Entamoeba* - - - *invadens* que crecen activamente con alta tensión de CO_2 a través de las precursoras hélices ribonucleoprotéicas, ponen de manifiesto la activación de algún mecanismo de regulación de síntesis de RNA inducido por CO_2 no -- descrito en este organismo, y abre una perspectiva en el camino hacia la - búsqueda de posibles nuevas estrategias para el estudio de la diferencia- ción de *Entamoeba*.

Asimismo, la inducción de la diferenciación en *Entamoeba invadens* por la acción del CO_2 y ayuno de glucosa, y el desfase de eventos (como son la formación de cuerpos cromatoides y síntesis de pared) que normalmen- te acontecen aparentemente asociados durante la diferenciación, abre tam- bién nuevas perspectivas en el estudio de los mecanismos de diferenciación y la biología del enquistamiento de este organismo, lo que a mediano plazo, con la integración de este tipo de conocimiento a nuevos datos aportados - al futuro, hará posible el manejo del enquistamiento de *Entamoeba* y, a tra- vés de esto, un posible control del ciclo enquistamiento-desenquistamiento tanto dentro de un hospedero como a nivel del medio ambiente.

R E F E R E N C I A S

- Albach, R.A.; Booden, T. y Boonlayangoor, P. (1977). **Entamoeba histolytica**: Autoradiographic analysis of nuclear sites of RNA synthesis. Exp. - - Parasit. 42: 248-259.
- Albach, R.A.; Booden, T.; Boonlayangoor, P., y Dowing, S. (1980). Concepts of function of peripheral non-chromatin and endosome in - - - - - **Entamoeba histolytica**. Arch. Invest. Me. (Méx.) 11 (Supl. 1): 63-74.
- Arroyo-Begovich, A. y Cáravez-Trejo, A. (1982). Location of Chitin in the cyst wall of **Entamoeba invadens** with colloidal gold tracers. - - - - - J. Parasitol. 68: 253-258.
- Arroyo-Begovich, A.; Cáravez-Trejo, A. y Ruiz-Herrera, J. (1978). Composición de la pared celular de quistes de **Entamoeba invadens**. Arch. - - - Invest. Med. (Méx.) 9 (Supl. 1): 99-104.
- Arroyo-Begovich, A.; Cáravez-Trejo, A. y Ruiz-Herrera, J. (1980). - - - - - Identification of the structural componente in the cyst wall of - - - **Entamoeba invadens**. J. Parasitol. 66: 735-741.
- Arroyo-Begovich, A.; Martínez-Palomo, A. y Sánchez-Pares, M.E. (1978). Formación de la pared celular durante el enquistamiento de **Entamoeba** - - **invadens**. Arch. invest. Med. (Méx.) 9 (Supl. 1): 105-112.
- Bailey, G.B. y Rengpien, S. (1980). Osmotic stress as a factor controlling encystation of **Entamoeba invadens**. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 11 - - - (Supl. 1): 11-16.
- Balamuth, W. (1962). Effects os some environmental factors upon growth -- and encystation of **Entamoeba invadens**. J. Parasitol. 48: 101-109.
- Band, R.N. y Cirrito, H. (1979). Growth response of axenic **Entamoeba** - - - **histolytica** to hydrogen, carbon dioxide, and oxygen. J. Protozool. 26: 282-286.
- Barker, D.C. (1963). Ribosome structures revealed by negative staining -- subcelular fractions from a crystalline ribonucleoprotein body. Exp. - Cell Res. 32: 272-279.

- Barker, D.C. y Deutsch, K. (1958). The chromatoid body of **Entamoeba** - - - **invadens**. Exp. Cell Res. 15: 604-639.
- Barker, D.C. y Svihla, G. (1964). Localization of cytoplasmic nucleic acid during growth and encystment of **Entamoeba invadens**. J. Cell Biol. 20: 389-398.
- Bartnicki-García, S. (1973). Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. Symp. of Soc. Gen. Microbiol. 23: 245-267.
- Bartnicki-García, S. (1963). Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi. III Hold yeast dimorphism of **Mucor**. Bacteriol. Rev. 27: - - 293-304.
- Behnke, O. (1963). Helical arrangement of ribosomes in the cytoplasm of - differentiating cells of the small intestine of rat foetuses. Exp. -- Cell Res. 30: 597-598.
- Brandt, H. y Pérez-Tamayo, R. (1970). Amibiasis, La Prensa Médica Mexicana, 1-19.
- Cabib, E. y Farkas, V. (1971). The control of morphogenesis: an enzymatic mechanism for the initiation of septum formation in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 62: 2052-2056.
- Cervantes-Mamoa, A. y Martínez-Palomo, A. (1980). Estudio del ciclo vital de **Entamoeba invadens** mediante cinematografía espaciada. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11 (Supl. 1): 31-40.
- Chang, S.L. (1942). Studies on **Entamoeba histolytica** I. Effect on hydrogen ion concentration on encystation of **E. histolytica** in culture. Am. J. Trop. Med. 22: 471-485.
- Chang, S.L. (1946). Studies on **Entamoeba histolytica**. J. Parasitol. 37: 101-112.
- Chavez, B.; Martínez-Palomo, A. y de la Torre, Margarita (1978). Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de **Entamoeba invadens**, - - - **E. histolytica** y **E. coli**. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9(Supl. 1): 113-116.

- Cleveland y Sanders (1930). Encystation, multiple fission without - - - - encystment, excystation, metacystic development, and variation in a -- pure line and nine strains of **Entamoeba histolytica**. Arch. Protistenk 70: 223-266.
- Czeto, A. R.; Morgan, R.S. y Strother, G.K. (1973). Tje ultraviolet - - - absorption spectra of chromatoid bodies of **Entamoeba invadens** in situ. Exp. Cell Res. 78: 345-350.
- Das, S.R.; Rastogi, A.K.; Sagar, P. y Singh, M.P. (1980). Axenic encystation of **Entamoeba invadens**. Indian J. Exp. Biol. 18: 333-336.
- De Robertis y De Robertis (1980). Cell and Molecular Biology. 7a. edition. Editorial Saunders College. p. 502.
- Diamond, L.S. (1968). Techniques of axenic cultivation of **Entamoeba** - - - **histolytica** Schaudinn, 1903 and **E. histolytica**-like amebae. - - - - J. Parasitol. 54:1047-1056.
- Diamond, L.S.; Harlow, D.R. y Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the - axenic cultivation of **Entamoeba histolytica** and other **Entamoeba**. Trans. of the Royal Society of Trop. Med. and hyg. 72: 431-432.
- Dobell, C. (1928). Researches on the intestinal protozoa of Monkey and - Man. I. General introduction and II. Description of the whole life - history of **Endamoeba histolytica** in cultures. Parasitology 20: 357-- 413.
- Everrit, M.G. (1950). The relationship of population growth to **in vitro**- - encystation of **Endamoeba histolytica**. J. Parasitol. 36: 586-594.
- Geiman, Q.M. y Ratcliffe, H.L. (1936). Morphology and life-cycle of an - - amoeba producing amoebiasis in reptiles. Parasitology 28: 208-228.
- Gutiérrez, G.; Ludlow, A.; Espinosa, G.; Herrera, S.; Muñoz, O.; Rattoni, N. y Sepúlveda, B. (1976). Encuesta Serológica Nacional. II Investi- gación de anticuerpos contra **Entamoeba histolytica** en la República Me- xicana, pp 599-608. En B. Sepúlveda y L.S. Diamond (eds) Memorias de la Primera Conferencia Internacional sobre Amibiasis, I.M.S.S.

- Holt, P.A. y Chapman, G. (1971). The fine structure of the cyst wall of the ciliated protozoon **Didinium nasutum**. *J. Protozool.* 18:609-614.
- Kagan, I.G. (1976). Seroepidemiology of amoebiasis. En B. Sepulveda y L.S. Diamond (eds.). *Memorias de la Primera Conferencia Internacional Sobre Amibiasis*. Instituto Mexicano del Seguro Social, México.
- Kang, M.S.; Elango, N.; Mattia, E.; Au young, J.; Robin, P.W. y Cabib, E. (1984). Isolation of chitin synthetase from **Saccharomyces cereviciae** - *J. Biol. Chem.* 259:14966-14972.
- Kusamrarn, T.; Sobhon, P. y Bailey, G.V. (1975). The mechanism of formation of inhibitor-induced ribosome helices in **Entamoeba invadens**. *J. Cell Biol.* 65:529-539.
- Kusamrarn, T.; Vinijchaikul, K. y Bailey, G.B. (1975a). Comparison of the structure and function of polysomal and helical ribosomes from **Entamoeba invadens**. *J. Cell Biol.* 65:540-548.
- Landa, L.; Aubanel, M.; Segovia, E. y Sepulveda, B. (1972). Seroepidemiología de la amibiasis en adultos. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 3 (Supl.2): 377-380.
- Lasman, M. (1977). Light and electron microscopic observations on encystment of **Acanthamoeba palestinensis**, Reich. 24:244-248.
- Lasman, M. (1982). The fine structure of **Acanthamoeba astronix**, *J. Protozool.* 29:458-464.
- Ludvik, J. y Shipston, A.C. (1970). The ultrastructure of **Entamoeba histolytica**. *Bull. Org. Mond. Santé.* 43:301-308.
- McConnachie, E.W. (1955). Studies on **Entamoeba invadens** Rodhain, 1934. *in vitro* and its relationships to some other species of **Entamoeba**. *Parasitology* 18:283-318.
- Mirelman, D. y Auron, A. (1988). Cyst formation in **Entamoeba**. En: Raudin, J.I. ed. *Amebiasis, Human Infection by Entamoeba histolytica*. U.S.A.: J. Wiley & Sons, 769-781.
- Monwell, M.D. (1968). *Introduction to Protozoology*. Second revised edition, 1968. Dover Publications Inc., N.Y. P.85.

- Morales-Vallarta, M.R.; Mata, B.D.; Ramírez-Bon, E. y Segura, J.J. (1982). División nuclear y presencia de microtúbulos en la diferenciación de **Entamoeba invadens**. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 13 (Supl.3):211-216.
- Morimoto, T.; Blobel, F. y Sabatini, D.D. (1972). Ribosome crystallization in chicken embryos. I Isolation, characterization, and *in vitro* activity of ribosome tetramers. J. Cell Biol. 52:338-354.
- Morimoto, T.; Blobel, F. y Sabatini, D.D. (1972a). Ribosome crystallization in chicken embryos. II Condition for the formation of ribosome tetramers *in vivo*. J. Cell Biol. 52:355-366.
- Olive, L.S. (1975). The Mycetozans. Academic Press, New York. pp 186-187.
- Ramos-Guerra, Mónica C. Diferencias estructurales de trofozoítos de - - - **Entamoeba invadens** cepa IP-1 en medio TP-S-1 con diferente tensión de CO_2 . Tesis profesional, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. Junio de 1987.
- Ratcliffe, H.L. y Geiman, Q.M. (1933). Eleven cases of amoebiasis in - - - reptiles. J. Parasitol. 20:139.
- Rengpien, S. y Bailey, G.B. (1975). Differentiation of **Entamoeba**: A new - medium and optimal conditions for axenic encystation of **E. invadens**. -- J. Parasitol. 61:24-30.
- Roth, L.E.; obetz, S.E. y Daniels, E.W. (1960). Electron microscopic studies of mitosis in amebae I. Amoeba Proteus. The J. of Biophys. and Biochem. Cytol. 8:207-220.
- Ruíz-Herrera, J.; Sing, V.O.; Van der Woude, W.J. y Bartnicki García, S. (1975). Microfibril assembly by granules of chitin synthetase. Proc. - Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:2706-2710.
- Siddiqui, W.A. y Rudzinska, M.A. (1965). The fine structure of axenically grown trophozoites of **Entamoeba invadens** with special reference to the nucleus and helical ribonucleoprotein bodies. J. Protozool. 12:448-459.
- Sirijintakarn, R. y Bailey, G.B. (1980). The relationship of DNA - - - - synthesis and cell cycle events to encystation by **Entamoeba invadens**. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 11(Supl. 1):3-10.

- Snyder, T.L. y Meleney, H.E. (1941). The excystation of **Entamoeba** - - -
histolytica in bacteriologically sterile media. Amer. J. Trop. Med. -
21: 63-73.
- Thepsuparungsikul, U.; Seng, L. y Bailey, G.B. (1971). Differentiation of
Entamoeba: Encystation of **E. invadens** in monoxenic and axenic cultures.
J. Parasitol. 57:1288-1292.
- Treviño, N. y Feria, V.A. (1971). Golgi complex in trophozoites of - - -
Entamoeba histolytica. 29th Ann. Proc. Electron Microscopy Soc. Amer.
- Vazquezdelara-Cisneros, L.G. y Arroyo-Begovich, A. (1984). Induction of -
encystation of **Entamoeba invadens** by removal of glucose from the culture
medium. J. Parasitol. 70:629-633.
- Waddington, C.H. y Perry, M.M. (1963). Helical arrangement of ribosomes in
differentiating muscle Cells. Exp. Cell Res. 30:599-600.
- Walsh, A.W. y Isquith, I.R. (1979). Scanning electron microscopy of cyst
of the ciliate **Blepharisma stoltei**. Trans. Amer. Micros. Soc. 98:261-264.
- Walsh, K.A. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis:
Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. -
Infect. Dis. 8:218-227.
- WHO Expert Comitee (1969). Amoebiasis. Technical Report No. 421, 1-52.