

1985 - 2

Cód. No. 078313269

Universidad de Guadalajara

Facultad de Ciencias



Cinética de Desenguistamiento de
Entamoeba invadens in vitro.

Tesis Profesional
para obtener el Título de:

B i ó l o g o

Presenta:

Jesús Carlos Ruvalcaba Ledezma

Guadalajara, Jal., 1988.

I N D I C E

	Pág.
I. Introducción.	1
II. Antecedentes.	6
- Posición Taxonómica de <u>Entamoeba invadens</u>	6
- Características particulares de <u>Entamoeba invadens</u>	8
- Similitudes de <u>E. invadens</u> con <u>E. histolytica</u>	9-
- Ciclo vital de <u>Entamoeba invadens</u>	17
- Enquistamiento y desenquistamiento en <u>E. invadens</u>	19
III. Planteamiento de la Hipótesis.	22
IV. Objetivos de la Investigación.	23
V. Material y Métodos.	24
- Material Biológico.	24
- Medio de Crecimiento.	25
- Medio de Enquistamiento.	25
- Cosecha de trofozoitos para su enquistamiento.	26
- Cuenta de células.	26
- Procedimiento de enquistamiento.	27
- Viabilidad.	27
- Procedimiento de desenquistamiento.	27
- Procedimiento de resiembra.	28
- Cinética de desenquistamiento.	29

VI. Resultados.	Pág. 30
VII. Discusión.	34
VIII. Conclusiones.	38
- Tablas y Figuras	38
- Bibliografía	47
- Carta de aceptación del tema de Tesis.	
- Carta de Visto Bueno del Director de Tesis.	

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. JUAN MORA GALINDO

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, División de Biología del Desarrollo de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social.

A MI MADRE:

Por el estímulo que representa en el logro y cumplimiento de objetivos fijados, venciendo obstáculos que limiten el fin de éstos.

A MI PADRE:

Por el apoyo y comprensión en tantos momentos de adversidad.

A MI ABUELO:

Por la confianza y cariño que en todos momentos me brindó.

A MIS HERMANOS:

Por la unión y cariño que en nosotros ha vivido.

A MI ESPOSA E HIJA

Por su sinceridad, apoyo y amor despertado en mi alegría y felicidad, para seguir cumpliendo objetivos en la vida.

AL M. EN C. JUAN MORA GALINDO Y

SRA. SUSANA R. DE MORA:

Por toda su ayuda y confianza,
como también por la estimulación
que me brindaron durante la elaboración
de este trabajo, su apoyo y una amistad
verdadera.

A MIS PROFESORES:

Por el gran cúmulo de conocimientos
impartidos con un objetivo particular
encaminado a dirigir en un futuro
mi formación profesional.

A MIS AMIGOS:

Por estar conmigo en momentos
difíciles y demostrarme su
amistad.

A LA UIBO - IMSS

Por permitir se llevara a
cabo este proyecto en el
Laboratorio de Cultivo de
Tejidos de la División
de Biología del Desarrollo

I. INTRODUCCION.

Los factores económico y social son determinantes en la prevalencia y distribución de las enfermedades parasitarias en el mundo. Dada la situación geográfica, económica y social de algunas regiones de nuestro país, la incidencia de enfermedades parasitarias es alta, teniendo como mayor porcentaje la helmintiasis y la amibiasis.

Existe una gran variedad de especies tanto comensales como patógenas; se les ha dado mayor importancia a las últimas, y a pesar de los múltiples conocimientos que en varios aspectos se tiene de las amibas, el estudio de éstas es cada día más importante, puesto que ponen en peligro la salud del hombre pudiendo privarlo de ella. El descubrimiento de las amibas pasó inadvertido para el padre de la Protozoología - Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723).

Más de dos siglos no bastan para tener un conocimiento completo de las amibas. En 1755 Roesel Von Rosenhof, quien era un tallador de lentes de profesión y microscopista por afición, da inicio al conocimiento de las amibas al observar un microorganismo que cambiaba de forma constantemente, al cual llamó "der kleine Proteus". Posteriormente Linnaeus lo designó como Chaos proteus y esto marcó la ruta en el descubrimiento de diversas especies de amibas, tales como:

Entamoeba gingivalis (Gros 1849), primera amiba parásita que conoció el hombre; en la actualidad se considera comensal; habita en el sarro dentario.

Entamoeba coli (Kudo 1980), se le considera también comensal en el intestino del humano.

Entamoeba histolytica (Losch 1857), conocida comunmente como la amiba de la disentería, aunque se sabe que existen además de las cepas patógenas, otras que son comensales.

En la clase rizopoda el género Entamoeba presenta especies patógenas no solo para el hombre, sino también para otros animales.

Entamoeba invadens, es parásita de serpientes y lagartijas, pero vive como comensal en tortugas, fue descubierta en 1933 por Ratcliffe y Geiman y aislada en 1934 por Rodhain.

La importancia que tiene esta última especie de amiba en la investigación científica es por su clara semejanza con Entamoeba histolytica, por lo que representa un modelo para realizar diversos estudios sobre la biología de estas amibas y en un momento dado poder extrapolar los datos obtenidos a Entamoeba histolytica. Existen numerosos trabajos sobre diversos aspectos de la Biología de Entamoeba invadens, sin embargo en relación al desenquistamiento in vitro sólo se han hecho observaciones cualitativas y de viabilidad celular (Cer

vantes Mamoa, 1980).

A pesar de que son diversos los estudios que se han realizado sobre el enquistamiento de Entamoeba invadens, no existe un trabajo donde se determine la cinética del desenquistamiento in vitro, para conocer o poder dilucidar el efecto de factores físicos y químicos que intervienen en la diferenciación de Entamoeba.

Una vez determinada la cinética de desenquistamiento de Entamoeba invadens in vitro, se utilizará como un control para probar el efecto de fármacos sobre quistes obtenidos axénicamente y someterlos posteriormente a proceso de desenquistamiento, evaluando así la actividad amebicida de tales fármacos. Esto para que en el futuro se pueda bloquear el ciclo biológico en la fase de quiste, la cual es la forma infectante en la patología conocida como amibiasis.

En términos generales la diseminación de la infección amibiana se encuentra a cargo de quistes viables a través de agua y alimentos contaminados, los trofozoítos no representan una forma infectante por su corta vida fuera del huésped y de ser ingeridos no soportarían la presencia del ácido clorhídrico y las enzimas gastrointestinales; por lo que el quiste es la forma infectante de tal patología, la que puede ser asintomática o invasora, siendo el clima un factor importante en la distribución de cepas patógenas, ya que los climas cálidos favorecen a éstas (Martínez Palomo y Martínez -

Báez, 1983).

En algunos cálculos aproximados se ha sugerido que el 10% de la población mundial da alojamiento a Entamoeba histolytica como comensal, pero también se encuentra más abundante como amibiasis invasora en Africa Occidental y del Sudeste, en el Sudeste de Asia, en México y en el Oeste de Sudamérica (Martínez-Palomo y Martínez-Báez, 1983).

Para el Estado de Jalisco en 1985 se observa que la frecuencia de amibiasis es más alta en los individuos de 14 a 44 años de edad con porcentaje de 37.50% (Tabla I). En cuanto a la mortalidad por amibiasis en 1980 ocupó el 0.8% en un total de 15,604 defunciones; acentuándose más en individuos de 1 a 4 y de 45 a 64 años de edad (Tabla II) y en cuanto a las principales causas de mortalidad se encontró que en el Estado de Jalisco durante 1980 la amibiasis se encuentra clasificada dentro de las principales causas de mortalidad (Tabla III).

Los esfuerzos por controlar la amibiasis han llevado al hombre a utilizar además de plantas para su curación, fármacos que desafortunadamente provocan efectos colaterales, como el metronidazol, que produce efectos mutagénicos y carcinogénicos en sistemas bacterianos y en roedores, aunque en humano no se ha comprobado tal efecto. La emetina, por otra parte, ha demostrado que es más nociva para células eucariotes que para Entamoeba histolytica y Entamoeba invadens (Se-

gura y López-Revilla, 1976).

Dada la semejanza de E. invadens con E. histolytica y por la facilidad de inducir el enquistamiento en forma axénica in vitro, se utilizó E. invadens para determinar la tasa de desenquistamiento y se obtuvieron datos que se podrían extrapolar a Entamoeba histolytica.

II. ANTECEDENTES.

POSICION TAXONOMICA DE Entamoeba invadens.

Dentro del phylum sarcomastigofora; los rizopodos son de gran importancia para el hombre; en la familia Endamoebidae existe el género Entamoeba, al cual pertenecen especies que son patógenas (Kudo, 1980).

Entamoeba invadens es un protozooario morfológicamente muy semejante a Entamoeba histolytica (McConachie, 1955), aunque existen algunas diferencias como: temperatura óptima de crecimiento, de alrededor de 25°C para Entamoeba invadens y de 37°C para Entamoeba histolytica; los huéspedes que parasitan son serpientes y el humano respectivamente.

Por otra parte, la inducción del enquistamiento masivo en medios axénicos con larga sobrevivencia es posible en Entamoeba invadens (Rengpien y Bailey, 1975).

Recientemente se ha reportado el enquistamiento axénico de E. histolytica, aunque con resultados pobres en relación a E. invadens (Rivera y Correa-Lemus, 1986; Mata-Cárdenas y Said-Fernández, 1986).

Clasificación actualizada
de Entamoeba invadens.

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Fílum I	Sarcomastigofora
Subfílum III	Sarcodina
Superclase I	Rhizopoda
Clase I	Lobosea
Subclase I	Gymnamoebia
Orden I	Amoebida
Suborden I	Tubulina
Familia	Endamoebidae
Género	Entamoeba
Especie	<u>Entamoeba invadens</u>

(Levine, et al. 1980)

CARACTERISTICAS PARTICULARES DE Entamoeba invadens.

E. invadens es una especie de amibas que parasita reptiles en los que provoca daños a nivel del estómago, intestino e hígado (Ratcliffe y Geiman, 1934). Se alimentan de secreciones mucosas así como de residuos celulares, leucocitos y bacterias.

La parasitosis en reptiles por Entamoeba invadens fue descrita por primera vez por Ratcliffe y Geiman en (1933) y a fines de 1934, Rodhain asignó a esta amiba el nombre de E. invadens n sp. En 1936 Ratcliffe y Geiman después de un estudio detallado concluyen que la amiba que habían descrito en 1933-1934, era un tanto diferente de E. histolytica y la asignan a la especie Entamoeba invadens (McConachie, 1955).

E. invadens presenta dos fases celulares en el ciclo de vida, una de quiste y otra de trofozoíto. El trofozoíto mide 7-30 μm de diámetro; posee motilidad rápida en base a la emisión de pseudópodos ectoplasmáticos. El citoplasma se encuentra bien diferenciado en ectoplasma que es hialino y en endoplasma granuloso. La nutrición del parásito en el huésped se realiza por fagocitosis a partir de leucocitos, hepatocitos, restos celulares y bacterias; se ha observado que si tiene a su alcance eritrocitos también los fagocita. El núcleo tiene un diámetro promedio de 4.78 μm , y posee gránulos cromáticos distribuidos uniformemente bajo la membrana nuclear, un cariosoma central rodeado de un pequeño halo y una "nube acromatina", la relación nucleocitoplasma en dife-

rentes cepas está en un rango de 0.26-0.34 μm , con un promedio de 0.295.

Los quistes tienen un diámetro de 11-20 μm con un promedio de 12.88 μm ; poseen de 1 a 4 núcleos, vacuolas con glucógeno y corpúsculos asiculares, en bastón o cilíndricos.

La formación del quiste tetranucleado ocurre en el intestino y el desenquistamiento en la serpiente ocurre en 5-14 horas; el tiempo de desarrollo metaquístico en el intestino de serpiente en su mayoría es de 12-14 horas, su temperatura de máximo crecimiento in vitro se obtiene el rango de 20 a 30°C (Geiman y Ratcliffe, 1936).

La pared del quiste de las amibas se forma como un mecanismo de resistencia frente a condiciones adversas que serían letales para el trofozoíto, ésto se ha demostrado in vitro ya que en el medio AEM (Rengpien y Bailey, 1975) se obtienen quistes, donde las condiciones no son óptimas para el trofozoíto y éste tiene que sintetizar una pared celular de quitina para sobrevivir. El espesor de la pared celular es de 100 nm (Chávez, 1978; Mora Galindo, et al, 1986) y está constituida por quitina (Arroyo Begovich, et al. 1980).

SIMILITUDES DE E. invadens CON E. histolytica.

Geiman y Ratcliffe (1936) realizaron estudios sobre la morfología y el ciclo vital de E. invadens tanto in vitro como in vivo, lo que los llevó a concluir que las especies

E. invadens y E. histolytica son extraordinariamente semejantes e inclusive morfológicamente indistinguibles.

McConachie (1955) opina que la semejanza se extiende a los procesos fisiológicos de diferenciación; también opina que la descripción de uno de ellos en una especie es aplicada a la otra y que en cuanto a morfología y patogenicidad, existe una gran semejanza entre E. invadens y E. histolytica, pero en diferente huésped.

COMPARACION MORFO - FISIOLÓGICA ENTRE
E. invadens y E. histolytica.

<u>E. histolytica</u>	<u>E. invadens</u>
TROFOZOITO:	
Tamaño: 7-35 μm ; promedio 20 μm	7-35 μm ; promedio 22 μm
Citoplasma:	
- Ectoplasma; abundante hialino diferenciado del endoplasma	Hialino diferenciado del endoplasma.
- Endoplasma; finamente granular y finamente vacuolado, no tiene mitocondrias retículo endoplasmático ni complejo de Golgi.	Vacuolado, granular, no tiene mitocondrias, retículo endoplasmático ni complejo de Golgi.
- Inclusiones; en trofozoítos invasores, eritrocitos, detritos celulares Sin bacterias.	En trofozoítos parasitando serpientes, restos celulares hepatocitos, leucocitos y bacterias.

Núcleo:

- Tamaño; 3.5 - 6 μm . 3.3 - 7.3 μm ; promedio 5 μm
- Cromatina periférica; gránulos cromáticos distribuidos bajo la membrana nuclear. gránulos cromáticos distribuidos bajo la membrana nuclear.
- Endosoma; pequeño central y único. Central rodeado de un pequeño halo y una nube acromática.
- Relación núcleo-citoplasma promedio 0.295 (varios investigadores). Promedio de diferentes cepas 0.295 (Geiman y Ratcliffe, 1936).

QUISTE:

- Tamaño; De 5-20 μm ; promedio 12-15 μm . De 11-20 μm ; promedio 13.88 μm ; (Geiman y Ratcliffe, 1936).
- Forma: Generalmente esférico, a veces ovoide. Generalmente esférico, raramente asimétrico.
- Número de núcleos: De uno a cuatro: cuatro en quistes maduros. De uno a cuatro; cuatro en quistes maduros.
- Tamaño de núcleos: de 3.2-5.7 μm ; (en quistes mononucleados) (Burrows, 1957). De 4.7 - 7 μm ; promedio 5.8 μm ; (en quistes mononucleados) (Cervantes, 1980).

Cromatina periférica:

- En pequeños gránulos distri
buídos con regularidad. Gránulos pequeños distribu
dos con regularidad, adosa-
dos a la membrana nuclear.
- Placas en la membrana nu--
clear. Dos a tres placas adosadas
a la pared interna nuclear.
A veces una sola, grande la
teralizada.
- Endosoma: Pequeño, central
o excéntrico. Central formado por uno o
varios gránulos.
- Relación núcleo-quística:
0.42 (Burrows, 1957). 0.34 (Cervantes, 1980).

CITOPLASMA:

- Cuerpos cromatoides: En for
ma de bastón con extremos -
redondeados. Aciculares, en bastón o ci-
líndricos.
- En forma ovoide o de puro.
- Escasos y grandes o numero-
sos y pequeños.
- Vacuola de glucógeno:
Única, mal definida. Única, grande que presiona
en ocasiones el núcleo con
tra la pared quística, dis
minuye de tamaño hasta de-
saparecer con la maduración.

Pared quística:

- Estructurada por una malla fibrilar compacta quitinosa y su grosor es de 125-150 nm.

(Chávez, Martínez-Palomo y De la Torre, 1978).

Estructurada por una malla fibrilar compacta quitinosa y su grosor es de 100-140 nm.

(Chávez, Martínez-Palomo y De la Torre, 1978; Mora Galindo et al, 1986).

CARACTERES FISIOLÓGICOS

Entamoeba histolytica

Entamoeba invadens

MOTILIDAD:

- Activa producción explosiva de pseudópodos romos direccional, progresiva, monopódica.

Rápida direccional, con producción explosiva de pseudópodos lobópodos ectoplasmáticos claros al cambiar de dirección.

CICLO VITAL:

- Se encuentra representado básicamente por la fase de quiste y la de trofozoíto.

Se encuentra representado básicamente por la fase de quiste y la de trofozoíto.

TEMPERATURA DE CRECIMIENTO:

- De 32-41°C; óptima de 37°C. (Dobell, 1926; Neal, 1966).

De 20-30°C; óptima de 23-24°C; amplitud posible 16-35°C. (McConachie, 1955)

CULTIVO:

- Se puede cultivar axénica-- Se puede cultivar axénica--
mente. (Diamond et al. 1978). mente. (Diamond et al. 1978)

ENQUISTAMIENTO:

- Se ha logrado en medios axé Se produce en medios axéni-
nicos aunque el rendimiento cos óptimos, en medios po--
es pobre en relación a E. - bres no se da el enquista--
invadens. (Rivera y Correa- miento. (Rengpien y Bailey,
Lemus, 1986, Mata-Cárdenas- 1975).
y Sail-Fernández 1986).

ERITROFAGOCITOSIS:

- Se observa en medio axénico, En reptiles no ingiere eri-
(Chevez A. et al, 1971). trocitos, pero sí de humano
- Existe en cepas invasoras, y carnero in vitro. (Trissl
(Trissl, et al, 1978). et al, 1978, Zaman 1970).

PATOGENICIDAD:

- Produce en el humano la con En serpientes o lagartijas-
dición conocida como amibia produce cuadros semejantes-
sis, la cual puede ser: a E. histolytica.
- Asintomática intestinal, di Preferentemente lesiona par
sentérica, colitis, ameboma. te superior del intestino -
delgado, estómago, hígado y
- Cutánea. es comensal en tortugas.
- Invasora; pulmonar, bazo, -
hígado y cerebro.
- Asintomática, (WHO; 1969). (Geiman y Ratcliffe, 1936).

SENSIBILIDAD A LOS AMEBICIDAS

- Más susceptible a la emetina que E. invadens. Los derivados de dicloroacetamida tienen una acción amebicida de 2-100 veces mayor que en E. invadens. (De Carneri, 1978; Neal, 1978).

(Citado por Cervantes-Mamoa-1980). (Segura, J.J. y López-Revilla, R., 1976).

CITODIERESIS:

- Bipartición se observó que se alarga por movimientos polares de separación, produciéndose un estrecho puente que se transforma en filamento citoplásmico y finalmente la separación de 2 trofozoítos.

- El tiempo de la bipartición suele ser entre 20 y 40 segundos.

Más resistente a la emetina que E. histolytica y a los derivados de dicloroacetamida.

(De Carneri, 1978; Neal, 1978):

(Segura, J.J. y López-Revilla, R., 1976).

Presenta dos modalidades: por estrangulación, ocurre cuando cesa de desplazarse se redondea tomando una forma cilindroide con extremos redondos, se forma un estrechamiento en la zona ecuatorial y cuando ocurre la emisión de pseudópodos en sentido opuesto, se separando dando lugar a 2 trofozoítos.

- Se propone que existen trofozoítos gigantes con 20 núcleos que desprenden porciones de citoplasma con núcleos y éstos se transforman en nuevos trofozoítos, recordando este proceso la gemación.

(Chávez A., et al, 1971).

DIVISION NUCLEAR:

- Se sugiere sea similar para ambas especies, ya que se observa la bipartición de una estructura central densa a los electrones, formadora y organizadora de los microtúbulos, alrededor de la cual se organizan los cromosomas, y posteriormente desaparece tal estructura en la profase.

(Morales-Vallarta, M., et al, 1982).

Por estiramiento, la célula fija al sustrato emite pseudópodos en sentido opuesto, se forma un puente citoplásmico hasta convertirse en un hilo ténue que se rompe y se separa en dos células.

Se demostró que las divisiones nucleares ocurren principalmente durante las 28 y 32 horas de inducido el enquistamiento.

(Cervantes-Mamoa, Martínez-Palomo, 1980).

Se determinó microtúbulos y cromosomas atípicos con movimientos sincronizados con una localización en el núcleo al azar, no se observa dilución de la envoltura nuclear. No se detectó centriolos (Morales-Vallarta, M., et al, 1982).

Coincidiendo la división nuclear en relación a la restricción de la síntesis de DNA (Sirijintakarn, P., et al, 1980).

CICLO VITAL DE Entamoeba invadens.

En el ciclo vital de las amibas del género Entamoeba, se presentan dos fases; una de trofozoíto y otra de quiste, para el estudio del ciclo vital in vitro es fundamental la inducción del enquistamiento, en la actualidad existe un procedimiento para inducir el enquistamiento de Entamoeba invadens en el medio AEM (Rengpien y Bailey, 1975). Y de esta manera se ha podido estudiar este proceso mediante fotocinmicrografía (Cervantes-Mamoa, 1980), así como el efecto de fármacos durante la diferenciación (Mora-Galindo, et al, 1986).

Durante el proceso de enquistamiento ocurre la partición múltiple del núcleo, el quiste joven es mononucleado, al madurar contiene cuatro núcleos, cuando eclosiona da origen a un trofozoíto tetranucleado, los núcleos se dividen una vez por división, ya sea estiramiento o estrangulación, se obtienen finalmente ocho amebuelas (Cervantes-Mamoa, 1980).

El enquistamiento en el huésped ocurre en el intestino,

pero además puede ocurrir cuando los trofozoítos han invadido el hígado (Ratcliffe y Geiman, 1934). Al ocurrir la formación de quistes en el huésped, éste los elimina en los materiales fecales, si éstos son viables y son ingeridos por otro huésped, en éste ocurre el desenquistamiento de trofozoítos tetranucleados y por división se originan finalmente ocho amebuelas por trofozoíto tetranucleado, estableciéndose así la patología conocida como amibiasis en reptiles (Ratcliffe y Geiman, 1934).

Meerovitch (1958) demostró que E. invadens es parásito para serpientes, mientras que para tortugas no lo es, esto en Chrgsemyspicta, (Kudo, 1980).

Se ha demostrado que en serpientes infectadas con E. invadens incubadas a una temperatura de 13°C no existe efecto patológico, en cambio a 25°C sí se mostró tal efecto, el que fue desde ligero a severo (Kudo, 1980).

Entamoeba invadens incluye varias especies de reptiles como ^hhésped:

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| - <u>Varanus salvator</u> | - <u>Natrix rhombifer</u> |
| - <u>Varanus varius</u> | - <u>Natrix spidon</u> |
| - <u>Tiliqua scincoides</u> | - <u>Natrix sipedon sipedon</u> |
| - <u>Pseudoboa cleila</u> | - <u>Natrix cyclopion</u> |
| - <u>Lampropeltis getulus</u> | - <u>Python sebae</u> |
| - <u>Ancistrodon mokasen</u> | - <u>Rachidelsus brazili</u> |

(Kudo, 1980).

ENQUISTAMIENTO Y DESENQUISTAMIENTO EN *E. invadens*.

El proceso de enquistamiento es una fase del ciclo vital de *E. histolytica*, el cual no es posible realizarse en medio axénico y los estudios que se hacen para esta especie de amiba se realizan con quistes de portadores asintomáticos. (Chávez, et al, 1978). Este proceso de enquistamiento es inducible fácilmente en *E. invadens* con lo cual esta especie constituye un modelo para el estudio del enquistamiento en *Entamoeba*.

Mediante estudios a nivel de microscopía electrónica de quistes de *E. histolytica*, *E. coli* y *E. invadens* se ha concluido que no hay diferencias significativas en cuanto a la estructura de la pared del quiste, ya que en todas las especies analizadas ésta estuvo constituida por material fibrilar (Chávez, et al, 1978). Sin embargo los autores consideran que en cuanto a la formación de la pared del quiste pueden existir diferencias debido a la presencia de vacuolas sub-membranales con contenido fibrilar en los quistes de *E. invadens* y dichas vacuolas son escasas en *E. histolytica* y en *E. coli*; en cambio en estas dos especies se observó proximidad de polirribosomas a la membrana plasmática del quiste, con invaginaciones de la misma. Por lo tanto, se afirma que son semejantes en cuanto al tipo de material fibrilar de la pared quística, pero el proceso de depósito de este material y su síntesis puede ser diferente para cada especie (Chávez-

et al, 1978). Se ha demostrado la presencia de quitina en la pared del quiste de E. invadens mediante colorantes que florecen al contacto con las fibras de la quitina (Arroyo-Begovich et al, 1980b). En base a este hallazgo es posible seguir la síntesis de quitina durante el proceso de diferenciación mediante el calcofluor M2R (Arroyo-Begovich, 1980c).

Por otro lado se ha observado que el colorante calcofluor M2R interfiere en el proceso de enquistamiento en E. invadens, donde probablemente altera la síntesis del aminopolisacárido quitina ya que este colorante se asocia a las fibras de quitina no solo cuando éste ha sido sintetizado, sino también cuando está siendo sintetizado (Arroyo-Begovich, 1982).

Sobre las fases del enquistamiento, se sabe que el trofozoíto pasa por una etapa prequística donde es más pequeño que el trofozoíto y de forma redonda, con un solo núcleo. Se encontró durante la filmación de este proceso, que ocurre alternancia de períodos con gran actividad y de quietud, donde los pseudópodos que emite son cortos y anchos, sin ocurrir desplazamiento. La aparición de los cuerpos cromatoides, la vacuola de glucógeno y la pared quística culmina la fase de enquistamiento (Cervantes-Mamoa, 1980). Por otra parte se ha propuesto que el quiste se forma dentro del trofozoíto y que cuando éste es liberado deja un saco de membrana (Arroyo-Begovich et al, 1978), aunque tam-

bién se ha propuesto que este saco de membrana se produce como resultado de una respuesta anormal de trofozoítos al estímulo inductor del enquistamiento. (Arroyo-Begovich, et al, 1980a).

El desenquistamiento no se ha estudiado en forma sistemática, sólo se ha hecho observaciones como parte del ciclo vital en E. invadens y los estudios son sólo cualitativos y se desconoce mucho sobre esta fase en el ciclo vital. (Cervantes-Mamoa, 1980).

Mediante el uso de quitina radioactiva. En extractos de quistes de E. invadens en proceso de enquistamiento, se detectó que existen la actividad de quitina sintetasa, para la síntesis de la quitina, así como la actividad de quitinasa que hidroliza a ésta en N-acetilglucosamina y N,N-diacetil quitobiosa.

Estos productos se detectaron mediante cromatografía en placas de DE-AE celulosa, en cambio en trofozoítos no se detectó tal actividad (Ramírez-Rojas, et al, 1982).

En otros estudios realizados sobre la diferenciación de E. invadens se ha observado que la ultraestructura de quistes difiere de los controles, cuando se obtienen bajo el efecto de fármacos como emetina, tinidazol y rifampicina (Mora-Galindo, et al 1986).

III. PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS.

Los trofozoítos de Entamoeba invadens se pueden cultivar axénicamente en el medio BI-S-33 y se pueden obtener quistes in vitro en el medio AEM. Por lo tanto, al incubar los quistes de Entamoeba invadens obtenidos axénicamente en el medio AEM en el medio de crecimiento BI-S-33, ocurre el desenquistamiento de tales quistes y con ello se puede determinar así la cinética de desenquistamiento.

IV. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION.

Obtener quistes de Entamoeba invadens en condiciones - axénicas en el medio de enquistamiento AEM.

Provocar el desenquistamiento de los quistes obtenidos, incubándolos en el medio de crecimiento BI-S-33.

Cuantificar el desenquistamiento de Entamoeba invadens a diferentes períodos.

Determinar la cinética del desenquistamiento de Enta--
moeba invadens in vitro.

V. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO:

Se utilizaron trofozoítos de Entamoeba invadens de la cepa IP-1, aislada en 1952, en el Instituto de Parasitología de la Universidad de McGill de Quebec, Canadá, de una serpiente Natrix cyclopion importada de Florida, esta cepa se mantiene desde 1952 in vitro. El Dr. Rubén López Revilla donó la cepa a la UIBO, IMSS hace 6 años, la cepa original le había sido donada por el Dr. Louis S. Diamond.

MEDIO DE CRECIMIENTO:

El medio que se utilizó fue el BI-S-33 cuyos componentes se indican en la Tabla V (Diamond et al, 1978). Luego de pesar sus componentes se disolvieron con agua bidestilada, se ajustó el pH a 6.8 con Na OH 1N, se le agregó el suero y vitaminas y se aforó con agua bidestilada hasta el volumen deseado. Para prevenir la contaminación se utilizaron antibióticos cuando fue necesario. En una campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas, se esterilizó el medio por filtración con membranas Millipore con poro de 0.22 μ m de diámetro y posteriormente se le determina la osmolaridad, la cual debió estar en rango de 370-400 mOsm/Kg. Como una medida de seguridad se dejó a prueba de esterilidad a 37°C durante 24 horas para su posterior utilización.

El suero utilizado fue inactivado para evitar el efecto del complemento, la inactivación se efectuó en baño maría a una temperatura de 56°C durante 30 minutos, luego de ser inactivado el suero bovino se dejó enfriar y se preparó una mezcla de éste con una suspensión de vitaminas, en condiciones asépticas para evitar la contaminación de la mezcla. Para 100 ml de suero bovino se utilizaron 20 ml de la suspensión de vitaminas (Mezcla de Diamond).

Luego de preparar la mezcla del suero y vitaminas se distribuyó en tubos de ensaye con 9 ml, donde cada tubo se utilizó para la preparación de 50 ml de medio de crecimiento BI-S-33, una alícuota de la mezcla se sometió a prueba de esterilidad a 37°C durante 24 horas; si en este período no se observó contaminación, se guardaron las unidades en el congelador para su conservación y posterior utilización.

MEDIO DE ENQUISTAMIENTO.

Se empleó el medio AEM (Axenic Encystment Medium), desarrollado por Rengpien y Bailey en 1975, en este medio se han descrito resultados positivos para el enquistamiento de Entamoeba invadens, sus componentes se indican en la Tabla IV - luego de pesar sus componentes se disolvieron con agua bidestilada, se ajusta el pH a 7 con Na OH IN, se le agrega suero bovino dializado y se afora con agua bidestilada hasta el volumen deseado; para prevenir la contaminación durante el en-

quistamiento se utilizaron antibióticos. En una campana de flujo laminar en condiciones asépticas se esterilizó el medio AEM con membranas Millipore con poro de 0.22 μm de diámetro y posteriormente se determina la osmolaridad, la cual debió ser de 70 mOsm/kg. luego se guardó a una temperatura de 2°C para su posterior utilización (Rengpien y Bailey - - 1980).

COSECHA DE TROFOZOITOS PARA SU ENQUISTAMIENTO.

De los tubos de cultivos previamente enfriados en - - agua-hielo durante 5-7 minutos, se tomó una alícuota para - - determinar el número de trofozoítos en Cámara de Neubauer - - (C.N.E.B., 1980), si la densidad fue adecuada (2×10^5 células/ml), se enfriaron los tubos en agua-hielo durante 5-7 - - minutos, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, y se - - descartó el medio; la pastilla resultante se utilizó para - - los experimentos de enquistamiento.

CUENTA DE CELULAS

Para la cuantificación de las amibas se utilizaron Cámaras de Neubauer (C.N.E.B., 1980). Los tubos de cultivo - - se colocan en baño de agua-hielo durante 5-7 minutos, con - - el fin de desprender las células de las paredes del tubo, - - se agitó el tubo y bajo condiciones asépticas se tomó la - - muestra con una pipeta Pasteur y se colocó en la Cámara de

Neubauer para determinar en número de trofozoítos por mililitro. Este procedimiento se utilizó tanto para cuantificar trofozoítos como para cuantificar el enquistamiento.

PROCEDIMIENTO DE ENQUISTAMIENTO.

Los trofozoítos cosechados en fase logarítmica de crecimiento fueron transferidos al medio de enquistamiento, el inoculo fue de 2×10^5 trofozoítos/ml, en 7 ml de medio AEM. Se incubó a 25°C y se cuantificaron tanto quistes como trofozoítos cada 24 horas hasta las 72 horas, para calcular el porcentaje de enquistamiento, en relación a trofozoítos y quistes obtenidos.

VIABILIDAD

La viabilidad se determinó mediante la exclusión del colorante azul tripano al 0.1%, en una muestra de 0.1 ml de cultivo con igual volumen de colorante, los quistes viables excluyen el colorante, lo contrario ocurre en los quistes muertos.

PROCEDIMIENTO DE DESENQUISTAMIENTO.

Una vez concluidas las 72 horas del proceso de enquistamiento y una vez realizados los cálculos sobre el enquistamiento se procedió de la siguiente manera:

- El cultivo se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se descarta el medio hasta dejar aproximadamente 2 ml del mismo y el paquete celular con trofozoítos y quistes.
- Se trató la pastilla con 2 ml de N-Lauril Sarkosil al 0.2% para destruir los trofozoítos, dejando en reposo 3 minutos y posteriormente mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos se obtuvo la pastilla de células, se descartó el detergente y se lavaron los quistes con solución salino-amibas.
- El lavado de los quistes se llevó a cabo con la solución salino-amibas, centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos de 2 a 4 veces.
- Se descartó la solución salino-amibas y se agregaron 7 ml de medio de crecimiento BI-S-33 (Diamond et al. 1978), para inducir el desenquistamiento.

PROCEDIMIENTO DE RESIEMBRA

Para obtener las amibas de un mismo tubo y someterlas posteriormente a enquistamiento en el medio AEM, se inoculó un promedio de 1×10^4 trofozoítos/ml en el medio BI-S-33, en tubos de 16 X 125 mm, con 7 ml de medio cada tubo. Los cuales se revisaron cada 24 horas para verificar que no existiera contaminación, así como para comprobar su actividad celular y determinar si presentaron la forma amebioidea caracte

rística. Se incubaron a 25°C para ser utilizados en los experimentos.

CINETICA DE DESENUSTAMIENTO

Una vez colocados los quistes en el medio BI-S-33, se realizaron observaciones en el microscopio invertido cada 24 horas, y se cuantificaron tanto quistes como trofozoítos en cámaras de Neubauer, hasta las 72 horas.

- Se realizaron algunos experimentos lavando con sarkosil - c/24 Hs. para detectar a qué tiempo ocurre el mayor porcentaje de desenquistamiento, ésto hasta las 72 horas de incluido el proceso de desenquistamiento.

- También se realizaron observaciones de cultivos en desenquistamiento c/12 Hs. para verificar a qué tiempo se inició el desenquistamiento.

VI. RESULTADOS

Entamoeba invadens presentó crecimiento exponencial, durante el período de cultivo; se observó que al incubar 1×10^4 células/ml, el crecimiento fue lento durante los primeros 4 días después de la inoculación de las amibas al medio de cultivo BI-S-33. Durante esta primera fase (lag) las amibas se preparan para el crecimiento acelerado (fase log), la cual se observó entre los días 4 y 9 posteriores a la resiembra y en esta fase se observaron las células con la forma ameboide característica, con emisión activa de pseudópodos. Comunmente se forman grandes colonias de trofozoítos, las cuales se encuentran suspendidas en el medio.

La fase estacionaria se observó aproximadamente a los 10 días de inoculadas las amibas al medio BI-S-33, y se encontró que las células ya no se dividen en la misma proporción que en la fase log; se observó además que simultáneamente perdieron la forma ameboide que las caracteriza y se observaron además células que ya no fueron viables, ésto se comprobó al observar el tubo de cultivo al microscopio invertido encontrando restos celulares o fantasmas, los que fueron más abundantes a los 12-14 días de cultivo; ésto marcó en el cultivo celular el inicio de la fase de declive o muerte celular (Fig. 1).

En cuanto al proceso de enquistamiento se observó que-

los trofozoítos que formaron colonias se enquistan antes que las células adheridas a la pared del tubo. Al transferir los trofozoítos al medio AEM las células se redondearon y el citoplasma adquirió un aspecto vacuolar, se observó poca emisión de pseudópodos, los que se formaron fueron cortos y hialinos. A las 24 horas las células adheridas a la pared del tubo mostraron emisión activa de pseudópodos y en su mayoría permanecieron así hasta las 72 horas; en cambio en las colonias de trofozoítos se observaron quistes desde las 24 horas y a las 72 horas las colonias fueron cúmulos de quistes, los que son refringentes al observarlos al microscopio invertido.

El rendimiento de quistes obtenidos se muestra en la Figura 2. La viabilidad de los quistes únicamente se determinó a las 72 horas de inducido el proceso de enquistamiento y fue de 77.9%.

A las 72 horas aparecen también restos celulares, lo que nos indicó que ocurre lisis de trofozoítos que no se adaptan al medio y se desintegran.

En los cultivos de trofozoítos tratados con sarkosil al 0.2% y lavados con salino amibas, no se observaron trofozoítos viables al recultivar en medio BI-S-33 nuevo, a 25°C sólo se observó restos celulares, lo que confirma que los trofozoítos no resisten el tratamiento con sarkosil.

En los tubos de amibas en proceso de enquistamiento al ser tratados con sarkosil al 0.2% y lavados con salino amibas no se observaron trofozoítos, por lo que los trofozoítos resultantes en el proceso de desenquistamiento son trofozoítos nuevos, productos de los quistes.

En tres experimentos en que se lavaron los cultivos en desenquistamiento con sarkosil al 0.2% y salino amibas cada 24 horas se observó que en las primeras 24 horas existían algunos trofozoítos; a las 48 horas se observaron más trofozoítos que a las 24 horas y a las 72 horas menos que a las 48 horas, por lo que se determinó que el tiempo de mayor desenquistamiento ocurre a las 48 horas. A través del microscopio invertido se determinó que el desenquistamiento se inició desde las 12 horas de haber transferido los quistes al medio de crecimiento, pero no fue cuantificable en el hematómetro, solo se observó uno-dos trofozoítos grandes por campo, los que presentaron movimiento lento. A partir de las 24 horas fue posible cuantificar el desenquistamiento en relación al porcentaje de los quistes inoculados; en la Figura 3 se muestran los resultados. Se observó que algunos quistes no se han desenquistado después de las 72 horas.

De una serie de experimentos se seleccionó un tubo de quistes sometidos a desenquistamiento y se obtuvo una población de amibas a la cual se designó como UIBO-RL para dife-

renciarla de la cepa original IP-I, y se mantuvo mediante cambios de medio; se requirieron varios cambios para obtener una curva de crecimiento similar a la de la cepa original Fig. 1 con inoculos de 1×10^4 trofozoítos/ml.

Durante el proceso de desenquistamiento se observó una disminución de los quistes paralela a la aparición y aumento en el número de trofozoítos (Fig. 4).

VII. DISCUSION

Los tratamientos utilizados para combatir la amibiasis son principalmente específicos para destrucción de trofozoítos (Segura, J.J. 1976; Martínez-Palomo y Martínez-Báez, - 1983), sería importante encontrar fármacos o factores químico-biológicos que actúen con especificidad sobre quistes y así bloquear el ciclo biológico de Entamoeba; de esta manera se evitaría la dispersión del parásito y en consecuencia la infestación de nuevos huéspedes.

En este trabajo se utilizaron trofozoítos de Entamoeba invadens para analizar el proceso de diferenciación de trofozoíto a quiste y de éste nuevamente a trofozoíto.

En cuanto a esta investigación se obtuvieron quistes - en condiciones axénicas en el medio de enquistamiento (AEM), pero el rendimiento fue menor al citado por Rengpien y Bailey (1975); ésto pudo deberse a que:

- La calidad del suero no fue la adecuada.
- No todos los trofozoítos se adaptan a las condiciones del medio (AEM).
- El enquistamiento ocurre más rápido en las colonias de trofozoítos y permanecen formando cúmulos de quistes y al momento de cuantificar si aparecían cúmulos en la cámara de Neubauer se contaron como un quiste y no como los quistes

totales del cúmulo.

- Es probable que el sarkosil no solo destruya trofozoítos, sino también a algunos quistes, ya que sólo se cuantificó los que se observaron íntegros y se observó restos celulares que podrían ser no solo de trofozoítos, sino también de quistes.

Cervantes-Mamoa (1980) indica que a las 72 horas el desenquistamiento es masivo desde el punto de vista cualitativo, lo cual no coincide con nuestros resultados, aunque en este caso el desenquistamiento se provocó en el medio de crecimiento BI-S-33 (Diamond et al. 1978). La transformación de quiste a trofozoíto en períodos menores a 24 horas no fue cuantificable en el hematímetro, después de 24 horas y hasta las 72, el rendimiento fue pobre en relación a los datos que se esperaban, es decir, se preveía un desenquistamiento masivo. Bajo el microscopio invertido parece ser que sí ocurre, sin embargo, al realizar la cuantificación no es así. Las razones de un bajo por ciento de desenquistamiento pueden ser algunas de las siguientes:

- Es probable que algunos quistes no se desenquisten.
- El sarkosil afecta algunos quistes.
- El suero utilizado (bovino) en los experimentos de desenquistamiento no fue efectivo para estimular el desenquistamiento.

- No todos los quistes fueron maduros.

En cuanto al tiempo de mayor desenquistamiento, éste ocurre a las 48 horas, aunque solo fue cualitativo al observar bajo el microscopio invertido mayor cantidad de trofozoítos a este tiempo, lo que nos hace pensar que a las 72 horas es mínimo el porcentaje de desenquistamiento y que el 14.11% obtenido en este período es producto de la suma de los trofozoítos obtenidos a las 24 horas y 48 horas de inducido el proceso de desenquistamiento más la división celular de los trofozoítos.

En relación a los resultados obtenidos, se sugiere que se utilice HCl (Martínez-Palomo y Martínez-Báez, 1983) en lugar de sarkosil para destruir los trofozoítos y evitar la formación de cúmulos de quistes para una mejor cuantificación, como también otro procedimiento de cuantificación para comprobar las variaciones en cuanto a los datos obtenidos bajo estas condiciones.

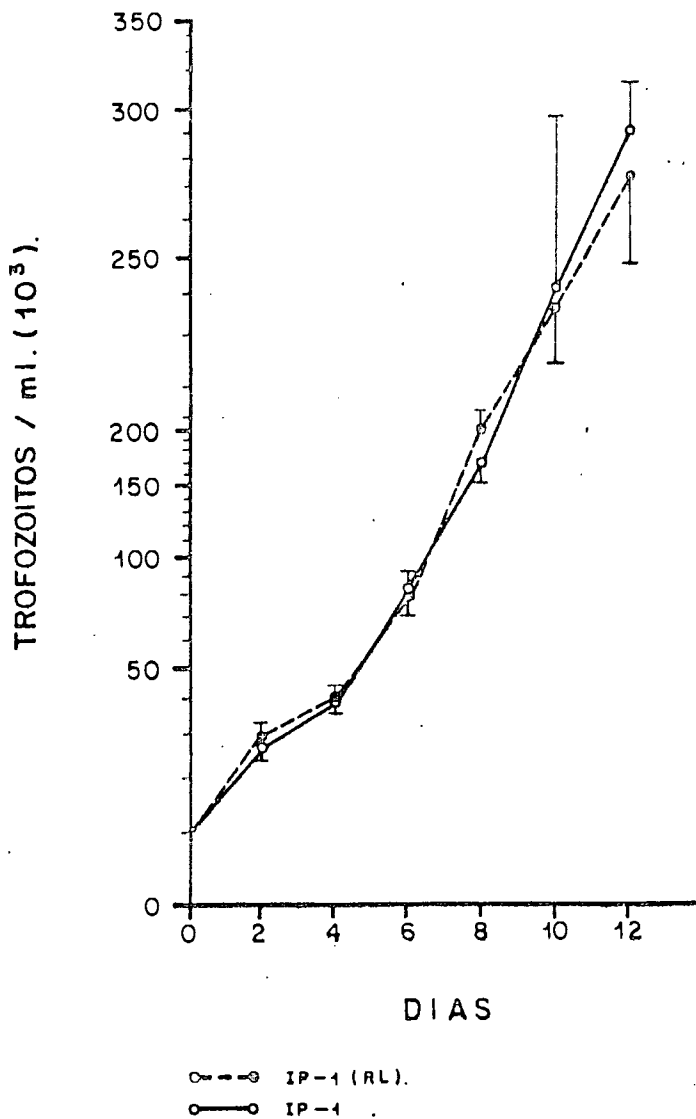
Es importante determinar el número de núcleos en los quistes para determinar el porcentaje de quistes tetranucleados, así como determinar el número de núcleos en trofozoítos obtenidos por el desenquistamiento.

VIII. CONCLUSIONES

- 1) Se obtuvieron quistes viables de Entamoeba invadens en condiciones axénicas en el medio de enquistamiento AEM.
- 2) Los primeros trofozoítos resultantes del proceso de desenquistamiento se observaron después de las 12 horas de inducir el desenquistamiento en el medio de crecimiento BI-S-33.
- 3) A las 48 horas de inducido el desenquistamiento en el medio de crecimiento BI-S-33, se observó el mayor número de trofozoítos en comparación con 12 y 72 horas.
- 4) Se cuantificó el desenquistamiento de Entamoeba invadens a diferentes períodos.

- Fig. 1 Curva de crecimiento de Entamoeba invadens IP-1 y IP-1 (RL).
- Fig. 2 Porcentaje de trofozoítos y quistes durante el enquistamiento de Entamoeba invadens en medio AEM.
- Fig. 3 Porcentaje de trofozoítos y quistes durante el desenquistamiento de Entamoeba invadens en el medio BI-S-33.
- Tabla I Frecuencia de amibiasis en el Estado de Jalisco, 1985.
- Tabla II Mortandad por amibiasis en el Estado de Jalisco, 1980.
- Tabla III Principales causas de mortalidad en el Estado de Jalisco, 1980.
- Tabla IV Componentes del medio de enquistamiento AEM.
- Tabla V Componentes del medio de crecimiento BI-S-33

Fig. 1.- CURVA DE CRECIMIENTO DE Entamoeba
invadens en medio BI-S-33 a 25°C.



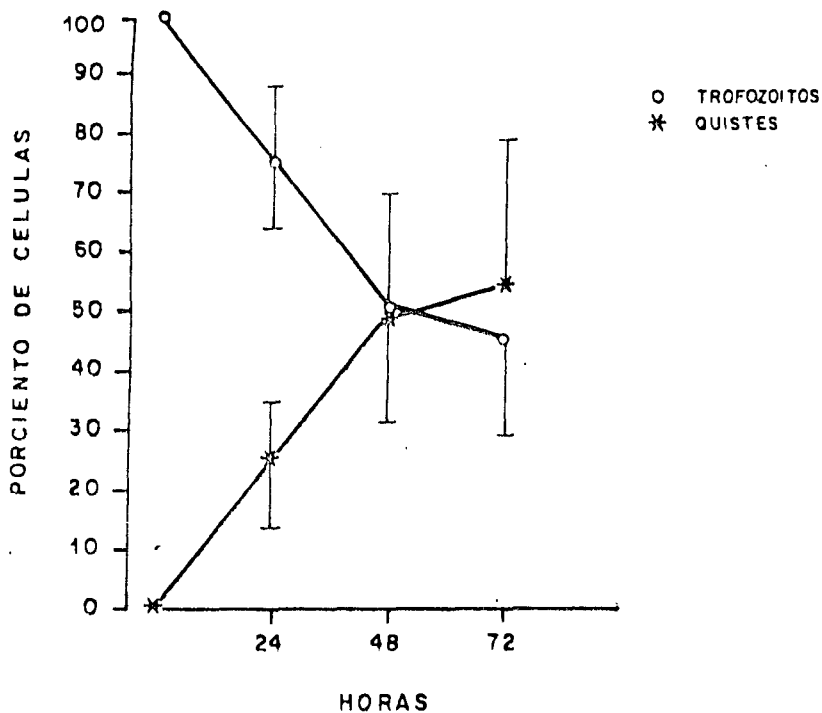


Fig. 2.- PORCIENTO DE TROFOZOITOS Y QUISTES DURANTE EL ENQUISTAMIENTO DE Entamoeba invadens EN MEDIO AEM.

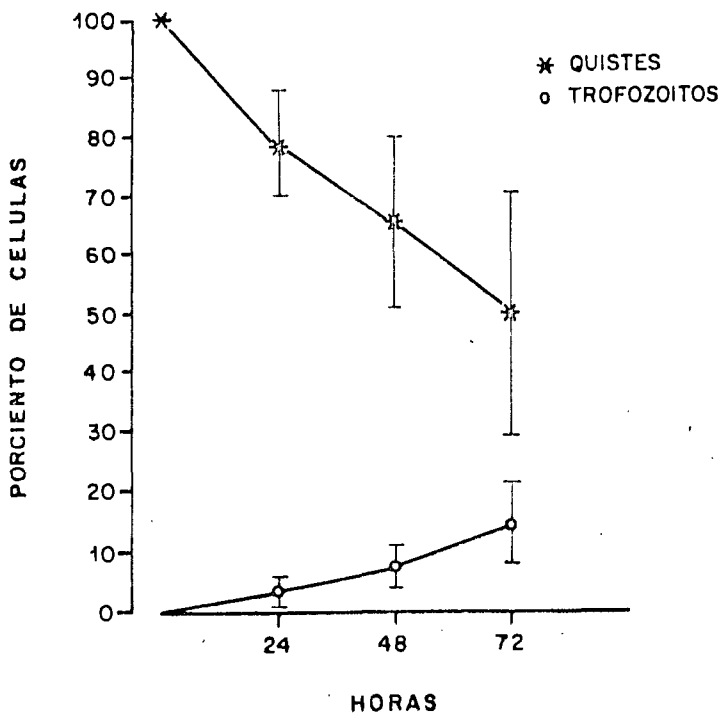


FIG. 3.- PORCIENTO DE TROFOZOITOS Y QUISTES DURANTE EL DEENQUISTAMIENTO DE Entamoeba invadens EN MEDIO BI-S-33.

TABLA I. FRECUENCIA DE AMIBIASIS EN EL ESTADO DE JALISCO, 1985.

GRUPOS DE EDAD EN AÑOS.	CLAVE*	FRECUENCIA	%
1	006	7 298	10.85
1-4	"	14 420	21.44
5-14	"	12 612	18.75
15-44	"	25 223	37.50
45-64	"	5 979	8.89
65 y +	"	1 716	2.55
T O T A L:		67 248	100

* CORRESPONDIENTE A LA AMIBIASIS EN EL DEPARTAMENTO DE SALUD DEL ESTADO DE JALISCO DE LAS SIGUIENTES DEPENDENCIAS:

SSA = 27 844

IMSS = 32 397

ISSSTE = 5 789

OTROS = 1 218

FUENTE:

INFORME SEMANAL DE CASOS NUEVOS DE ENFERMEDADES. DEPARTAMENTO DE SALUD EN EL ESTADO DE JALISCO, 1986.

TABLA II. MORTALIDAD POR AMIBIASIS EN EL ESTADO DE JALISCO (1980).

GRUPOS DE EDAD.	DEFUNCIONES	TASA	%
1-12 meses	16	9.7	0.4
1-4 años	13	2.1	2.0
5-14 años	2	0.2	0.4
15-24 años	3	0.4	0.4
25-44 años	11	1.2	0.7
45-64 años	30	6.4	1.1
65-74 años	22	18.4	1.0
75 y más años	27	42.0	0.8
T O T A L	124	2.8	0.8

POBLACION BASE 4 473 309

TOTAL DE DEFUNCIONES 15,604

FUENTE:

Certificados de defunción. Servicios Coordinados de Salud Pública en el Estado de Jalisco, Unidad de Programación, - 1980.

TABLA III. PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD
EN EL ESTADO DE JALISCO, (1980).

C A U S A	C L A V E	DEFUNCIONES	TASA	%
Tumores Malignos	140-208	1,460	32.6	9.4
Enfermedad Diarreica	008-009	831	18.6	5.3
Cirrosis Hepática	571	698	15.4	4.4
Diabetes Mellitus	250	637	14.2	4.1
Hisquemia Cardíaca	410-414	620	13.9	4.0
Enfermedad cerebro-vascular.	430-438	616	13.8	3.9
Desnutrición	260-263	520	11.6	3.3
Úlcera Gástrica y Duodenal	531-533	205	4.6	1.3
Meningitis	320-322	149	3.3	1.0
Amibiasis	006	124	2.8	0.8
Mal definidas	780-799	330	7.4	2.1
Resto		9,423	210.6	60.3
T O T A L:		15,604	348.8	100 %

POBLACION BASE 4 473 309

FUENTE:

Certificados de defunción Servicios Coordinados de Salud Pública en el Estado de Jalisco, Unidad de Programación, 1980.

TABLA IV. COMPONENTES DEL MEDIO DE ENQUISTAMIENTO
 AEM (Rengpien y Bailey, 1975).

TRIPTICASA	- - - - -	2 g.
EXTRACTO DE LEVADURA	- - - - -	2 g.
$K_2 HPO_4$	- - - - -	0.22 g
$KH_2 PO_4$	- - - - -	0.1 g
SUERO BOVINO DIALIZADO	- - - - -	25 ml
AGUA BIDEUTILADA c.b.p.	- - - - -	400 ml

TABLA V. COMPONENTES DEL MEDIO DE CRECIMIENTO BI-S-33
(Diamond, 1978).

PEPTONA BIOTRIPTASA - - - - -	4 g
GLUCOSA MONOHIDRATADA - - - - -	1.1 g
Na Cl - - - - -	0.27 g
$K_2 HPO_4$ - - - - -	0.1 g
$KH_2 PO_4$ - - - - -	0.06 g
CISTEINA - - - - -	0.1 g
AC. ASCORBICO - - - - -	0.02 g
CITRATO FERRICO DE AMONIO - - - - -	0.00228 g
MEZCLA DE SUERO Y VITAMINAS - - - - -	18 ml
AGUA BIDEESTILADA c.b.p. - - - - -	100 ml

BIBLIOGRAFIA

- Arroyo-Begovich, A., Martínez-Palomo, A., y Sánchez-Pérez, Ma. E. Formación de la pared celular durante el enquistamiento de Entamoeba invadens. Arch. Invest. Med. (Mex) 9 (Supl. 1): 105, 1978.
- Arroyo-Begovich, A., y Ramírez-Rojas, O. Origen de las paredes en forma de saco observadas en cultivos de Entamoeba invadens. Arch. Invest. Med. (Méx) 11 (Supl. 1) 17, 1980a.
- Arroyo-Begovich, A., Carabez-Trejo, A. y De la Torre, M. - Tinción de quistes de Entamoeba invadens, E. histolytica y E. coli con aglutinina de germen de trigo marcada con partículas de oro coloidal. Arch. Invest. Med. (Mex) 11 (Supl 1) 25, 1980b.
- Arroyo-Begovich, A., Carabez-Trejo, A., y Ruíz-Herrera, J. Identification of the structural component in the cyst wall of Entamoeba invadens. J. Parasitol 66: 735, 1980c.
- Arroyo-Begovich, A., y Almanza de Celis, S. Alteración del enquistamiento de Entamoeba invadens por calcofluor M2R. Arch. Invest. Med. (Mex) 13 (Supl. 3): 13, 1982.

- Burrows, R.B. Entamoeba hartmanii Am. J. Hyg. 65: 172, 1957. Citado por: Cervantes-Mamoa, A.C., 1980.
- Cervantes-Mamoa, A.C. Estudios de los procesos de división celular y nuclear en Entamoeba. Tesis de Maestría en Biología Celular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN México, D.F. 1980.
- Cervantes-Mamoa, A.C. y Martínez-Palomo, A. Estudios del ciclo vital de Entamoeba invadens mediante cinematografía espacida. Arch. Invest. Med (Mex) 11 (Supl. 1) 31, 1980.
- Cruz-López, O., Parasitología Mendez-Oteo Editor. Capítulo 4 Amibiasis. México, D.F. pp. 85-120, 1983.
- Chávez, B., y Martínez-Palomo, A. y de la Torre, M. Estructura Ultramicroscópica de la pared de quistes de Entamoeba invadens, E. histolytica y E. coli. Arch. Invest. Med. (Mex) 9 (Supl. 1): 113, 1978.
- Chávez, A., Segura, M., Iturbide, I. y Aubanel, M. Aspectos morfológicos en la biología del trofozoíto de Entamoeba histolytica desde el punto de vista de la citología dinámica. Arch. Invest. Med. (Mex) 2 (Supl. 1): 229, 1971.
- Diamond, L. S., Harlow, D.R. y Cunnick, C.C. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica

- and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:431, 1978.
- De Carneri, I. y Carnevali, C. Archivements and obstacles in research for new anti-amoebic drugs. Arch. Invest. Med. (Méx) (Supl. 1): 381, 1978.
- Dobell, C. y Laidlaw, P.O. On the cultivation of Entamoeba histolytica and some other entozonic amoeba. Parasitology 18, 1926.
- Geiman, Q.M. y Rotaliffe, H.L. Morphology an life-cycle of an amoebiasis in reptiles parasitol. 28: 208, 1936.
- Informe semanal de casos nuevos de enfermedades. Departamento de Salud en el Estado de Jalisco. 1986.
- Kudo, R.R. Protozoología CECSA, Sexta Edición. México, D.F. 426-427, 1980.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G. y Col. A newly revised classification of the protozoa. J. Protozool. 27:37-58, 1980.
- Martínez-Palomo, A., y Martínez-Báez, M. Amibiiasis. Salud Pública de México. 25, 1983.
- Mata, D.B., Cárdenas et. al. Wall synthesis in axenic cultures of Entamoeba histolytica grow in Pehps medium. Arch. Invest. Med. (Méx.) (Supl. 8) 25-30.

- Meerdvith, E. Some biological requirements and host-parasite relations of Entamoeba invadens. Can. J. Zool. 36:513, 1958.
- Morales-Vallarta, M., Mata, B., Ramírez-Bon, E. y Segura J.J. División Nuclear y presencia de microtúbulos en la diferenciación de Entamoeba invadens. Arch. Invest. Med. (Méx) 13 (Supl. 3): 211, 1982.
- Nora-Galindo, J., González-Cisneros, F. y Feria-Velasco, A. Ultraestructura de quistes de Entamoeba invadens obtenidos bajo el efecto de emetina, tinidazol y rifampicina. Arch. Invest. Med. (Méx) 17:113, 1986.
- McConachie, E.W. Estudios on Entamoeba invadens Rodhain, 1934, in vitro, and its relationship to some other species of entamoeba. Parasitol 45: 425, 1955.
- Neal, R.A. Antiamebic activity of drugs given singly and in combination against axenically grown Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx) 9 (Supl. 1) 387, 1978.
- Neal, R.A. Experimental studies on Entamoeba with reference to speciation advances in parasitology 4: 1, 1966.
- Ramírez-Rojas, O., y Arroyo-Begovich, A. Actividad quiti-nolítica de Entamoeba invadens. Arch. Invest. Med. (Méx) 13 (Supl. 3) 17, 1982.

- Ratcliffe, H.L. y Geiman, Q.M. Amibiasis in reptiles. Science. 79: 324, 1934.
- Rengpien and Bailey. Differentiation of Entamoeba encystation of E. invadens in monoxenic cultures. J. Parasitol 57: 6, 1288, 1971.
- Rengpien and Bailey. Differentiation of Entamoeba: A new medium and optimal conditions for axenic encystation of E. invadens. J. Parasitol 61: 24, 1975.
- Rengpien and Bailey. Osmotic stress as a factor controlling encystation of Entamoeba invadens, Arch. Invest. Med. (Méx) 11, (Supl. 1) 11, 1980.
- Ratcliffe, H.L. y Geiman, Q.M. Eleven cases of amoebiasis in reptiles. J. Parasitol 20: 139, 1933.
- Rivera, R.P. Enquistamiento axénico de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx) (Supl. 1) 19-23, 1986.
- Servicios Coordinados de Salud Pública en el Estado de Jalisco. Unidad de Programación, 1980.
- Segura, J.J. y López Revilla, R. Inhibition of protein synthesis by emetine in axenic Entamoeba histolytica and Entamoeba invadens strains. Arch. Invest. Méd. (Méx) 120-126, 1976.

- Sirijintakarns-Peerada, y G.B. Bailey. The relationship of DNA synthesis and cell cycle to encystation by Entamoeba invadens. Arch. Invest. Med. (Méx) 11 (Supl. 1) 3, 1980.
- Trissl, D., Martínez-Palomo, A., de la Torre, M., de la - Noz, R. y Pérez, E. Surface properties of Entamoeba: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. J. Exp. Med. 148, 1978.
- Who Expert Committe. Amoebiasis. Who Technical report series No. 421. Genova. 1969.
- Zaman, V. Ingestion of erythrocytes by Entamoeba. Acta Trop. 27: 178-183, 1970.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número 699/85

Sr. Jesús Carlos Ruvalcaba Ledezma
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de Tesis "Cinética de Desenquistamiento de
Entamoeba invadens in vitro" para obtener la Licenciatura en
Biología, con orientación Biomédica.

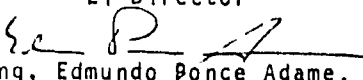
Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---
aceptado como Director de dicha Tesis el M. en C. Juan Mora-
Galindo.



FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Diciembre 3 de 1985-

El Director


Ing. Edmundo Ponce Adame.

El Secretario

Arq. Mario Patricio Castillo Paredes.

c.c.p. El M. en C. Juan Mora Galindo, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente del alumno.

'mjsd

Al contestar este oficio sírvase citar fecha y número

Guadalajara, Jal., Junio 23 de 1988

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA
Director de la Facultad de Ciencias
Universidad de Guadalajara
P r e s e n t e.

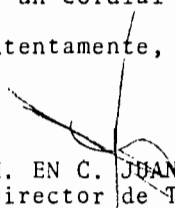
Estimado Dr. Astengo Osuna:

Por este medio comunico a usted que el señor JESUS CARLOS RUVALCABA LEDEZMA, Pasante de la Licenciatura en Biología, con número de Código 078313269 ha concluido el trabajo de Tesis titulada: CINETICA DE DESENQUISTAMIENTO DE Entamoeba invadens in vitro, realizada en la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente, I.M.S.S.

Asimismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,

M. EN C.  JUAN MORA GALINDO
Director de Tesis