

Producción masiva de quistes de *Entamoeba histolytica* en condiciones axénicas

SALVADOR SAID-FERNÁNDEZ*
BENITO DAVID MATA-CÁRDENAS
MARÍA TERESA GONZÁLEZ-GARZA
JUAN MORA-GALINDO
JOSÉ RUIZ-ORDÓÑEZ
LETICIA NAVARRO-MARMOLEJO

Después de la fase exponencial de crecimiento, las amibas de la cepa HK9, mantenidas axénicamente en el medio PEHPS, adquieren en forma espontánea varias semejanzas morfológicas con los quistes naturales y resistencia a choque hipotónicos por el efecto de una pared, la cual está compuesta parcialmente por polisacáridos. El número de amibas diferenciadas aumenta paulatinamente, pero su viabilidad disminuye, en función del tiempo de incubación, hasta que al noveno día 96 por ciento de la población está constituido por este tipo de células, si bien sólo 6 por ciento de ellas es viable. La estructura ultramicroscópica de la gran mayoría de las amibas diferenciadas corresponde a la de quistes inmaduros. Estos y el medio PEHPS constituyen un buen modelo para la caracterización de la iniciación de la diferenciación de E. histolytica y abren la posibilidad de obtener, en condiciones axénicas, cultivos masivos de quistes maduros del agente causal de la amebiasis.

CLAVES: *Entamoeba histolytica*, enquistamiento axénico, quistes.

SUMMARY

After an exponential phase of growth, HK9 strain amebas, kept in the axenic medium PEHPS, spontaneously acquire a form morphologically similar to various natural cysts, as well as a resistance to hypotonic shock, due to the effect of a wall, partially composed of polysaccharides. The number of differentiated amebas increases gradually, although their viability diminishes, in function of the incubation time. On the ninth day, 96% of the population is made up of these cells, although only 6% are viable. The ultramicroscopic structure of the great majority of differentiated amebas corresponds to that of immature cysts. These, and the PEHPS medium, constitute a good model for a characterization of the start of the differentiation of E. histolytica, and open the opportunity of obtaining, in axenic conditions, massive cultures of mature cysts.

KEY WORDS: *E. histolytica*, axenic medium, cysts.

Trabajo de ingreso del doctor Salvador Said-Fernández, presentado en sesión ordinaria de la Academia Nacional de Medicina, el 20 de septiembre de 1989.

* Académico numerario.

Salvador Said-Fernández, Benito David Mata-Cárdenas, María Teresa González-Garza y Leticia Navarro-Marmolejo. División de Biología Celular. Unidad de Investigación Biomédica de Nordeste. Instituto Mexicano del Seguro Social. Monterrey, N. L. Juan Mora-Galindo. División de Biología del Desarrollo, Unidad de Investigación Biomédica de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social. Guadalajara, Jal. José Ruiz-Ordóñez. Unidad de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L.

Se sabe bien que las amibas de la especie *Entamoeba histolytica* causantes de la amibiasis, pierden gradualmente sus movimientos y adoptan formas esféricas u ovals durante la fase prequistica. Entonces se inicia la maduración de los quistes, la cual consiste principalmente en la síntesis de la pared, división nuclear, una notable reducción del volumen celular, del número y tamaño de las vacuolas y en la aparición de cuerpos cromatoides. Este proceso normalmente se completa en el colon humano y es posible reproducirlo en cultivos polixénicos.¹ pero no en condiciones axénicas.²

En un nuevo medio (PEHPS) para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*,³ se encontró recientemente que después de la fase de crecimiento logarítmico las amibas sintetizan una pared, la cual aparece como una estructura rígida y translúcida, que flouece intensamente en presencia de *Calcofluor White M2R*, lo cual no ocurre con los trofozoitos.¹ En este trabajo se confirma dicho hallazgo, y se determina además que en el nuevo medio de cultivo, la mayoría de las amibas alcanza, en condiciones axénicas, un estado de quiste inmaduro, y que el enquistamiento se inicia al finalizar la fase logarítmica de crecimiento.

Material y métodos

Cepas amibianas axénicas

Se usaron las cepas HK9 e IP-1, de las especies *Entamoeba histolytica*³ y *Entamoeba invadens*,⁶ respectivamente. La primera se cultivó seriadamente en nuestro laboratorio por siete años, un año en TPS-1,⁵ y los otros seis en PEHPS,³ con una frecuencia de resiembra de cuatro días e inóculos de 1×10^3 amibas/ml. La axenicidad de los cultivos se comprobó como se describió previamente.³ La cepa IP-1 se subcultivó y se indujo su enquistamiento como se describió en una comunicación anterior.³

Microscopía electrónica de barrido y de contraste de fases

Tales estudios se realizaron con trofozoitos y amibas diferenciadas, procedentes de cultivos con res y 12 días de incubación, respectivamente. Los trofozoitos se prenfriaron en una mezcla de agua hielo, durante 10 minutos. Ambos tipos de células se cosecharon por centrifugación a 1000 X g durante 15 minutos, a 4°C.

Para los análisis con el microscopio electrónico de barrido, 2×10^6 amibas diferenciadas se lavaron tres veces con agua bidestilada; se fijaron con glutaraldehído al 2.5 por ciento en solución amortiguadora de fosfatos (PBS),⁷ a 4°C, por una hora, y se deshidrataron,

suspendiéndolas sucesivamente en concentraciones crecientes de alcohol, desde 50 por ciento hasta absoluto, sedimentándolas, entre cada paso, por centrifugación a 1000 X g, por 15 minutos, a 4°C, en tubos cónicos. La células se resuspendieron en 100 μ l de etanol absoluto y se depositó una gota de la suspensión en cubreobjetos de 3 mm por lado. Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente, se montaron en los portamuestras y se cubrieron con una película de oro de 4 nm, con un ionizador JFC 11000 (Jeol Limited, Tokyo) operado a 15 mA, 1.5 Kv, por tres min. Las micrografías se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido JSM-35C (Jeol Limited, Tokyo).

Estructura ultramicroscópica de las amibas diferenciadas

Las amibas diferenciadas de cultivos de seis días de incubación se separaron de los trofozoitos en un gradiente discontinuo de densidad, con 10 a 100 por ciento de Percoll isotónico,⁸ pero en lugar de PBS, se usó medio PEHPS como diluyente. Las amibas de las bandas de 30 y 40 por ciento de Percoll se lavaron tres veces con medio fresco y se prepararon y analizaron como se describió anteriormente en otra comunicación.

Reactivos

El dodecil sulfato de sodio, la glucosa y la cisteína se obtuvieron de Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri) El Percoll se obtuvo de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala) y todas las sales de Merck, México; todo lo anterior, en grado reactivo. El extracto de hígado y páncreas y el suero bovino estéril, componentes del medio PEHPS, se prepararon en el laboratorio de los autores.²

Resultados

Apariencia de las amibas diferenciadas en contraste de fases y microscopio electrónico de barrido

Bajo el microscopio de contraste de fases, las amibas diferenciadas aparecen con forma oval o esférica, de tamaño notablemente menor que el de los trofozoitos, más refringentes y con vesículas y vacuolas en menor número y más pequeñas que las de éstos (Fig. 1). Bajo el microscopio electrónico de barrido, las amibas presentan un superficie rugosa, con una gran depresión, como la que se muestra en la figura 2. La apariencia de las amibas diferenciadas y la de los quistes naturales, teñidos con yodo, es notablemente parecida. Ambos presentan una gran afinidad por el colorante en sus

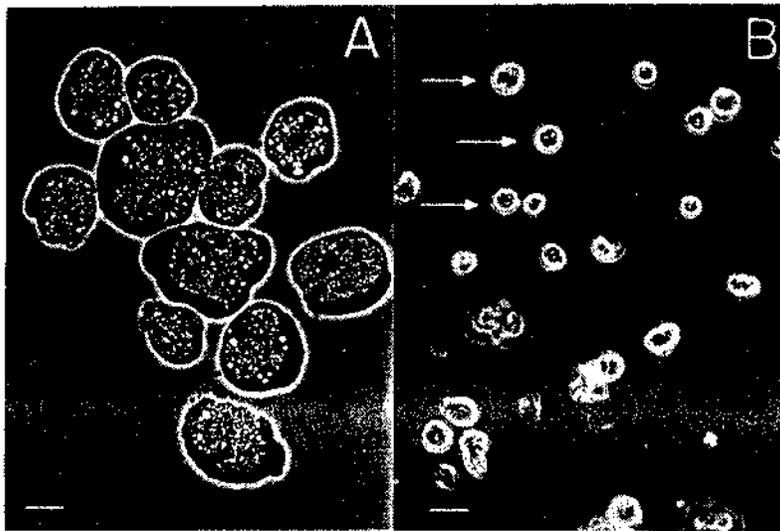


Figura 1. Apariencia de los trofozoítos en la fase logarítmica de crecimiento y de amibas diferenciadas, cultivadas axénicamente en medio PEHPS. (A) trofozoítos y (B) amibas diferenciadas. Las flechas señalan algunas amibas diferenciadas esféricas, pequeñas y refringentes. Barras, 10 μm .

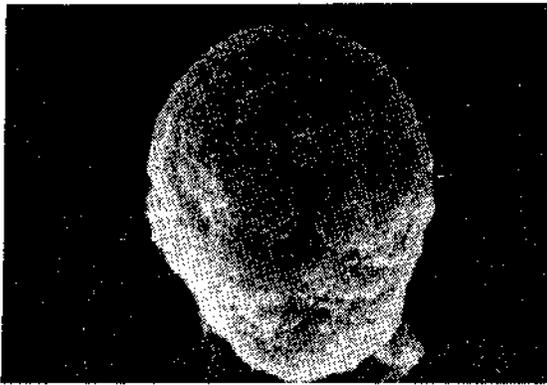


Figura 2. Apariencia de una amiba diferenciada, observada con microscopio electrónico de barrido. Barras 2.5 μm . Obsérvese la depresión central que presentan también los quistes de otras especies de amibas.

superficies, más de un núcleo, y escaso número de vacuolas, en comparación con las que presentan las amibas en estado mucho más temprano de diferenciación (Fig. 3). En otros trabajos se ha mostrado que dicho parecido también es claramente observable bajo el microscopio de contraste de fase¹ y de barrido.



Figura 3. Similitud morfológica de las amibas diferenciadas, cultivadas axénicamente en medio PEHPS y de los quistes naturales. Las preparaciones corresponden a frotis teñidos con Lugol. (A) Una amiba en un estadio temprano de diferenciación, proveniente de un cultivo axénico de 12 días de incubación a 36 °C, muestra numerosas vacuolas. (B) Un quiste maduro, aislado de heces humanas; (C) Una amiba diferenciada, tetranucleada, con una morfología muy parecida a la del quiste natural. Las flechas negras señalan las paredes de ambas células y las blancas, sus núcleos. Las amibas diferenciadas tetranucleadas son escasas en los cultivos, pero las binucleadas y mononucleadas con pared son abundantes.

Resistencia al choque hipotónico de las amibas diferenciadas

Como la pared confiere a los quistes resistencia a factores adversos, se analizó el efecto de uno de los más conocidos, la hiposmolaridad, sobre las amibas diferenciadas. Después de una hora de incubación en medio basal PEHPS diluido con volúmenes variables de agua bidestilada, se encontró que 100 por ciento de los trofozoítos se lisaron en un medio con tonicidad de 80 mOsm/kg, mientras que 75 por ciento de las amibas que provienen de un cultivo de 12 días de edad resistieron el choque hipotónico, incluso con agua bidestilada (Fig. 4).

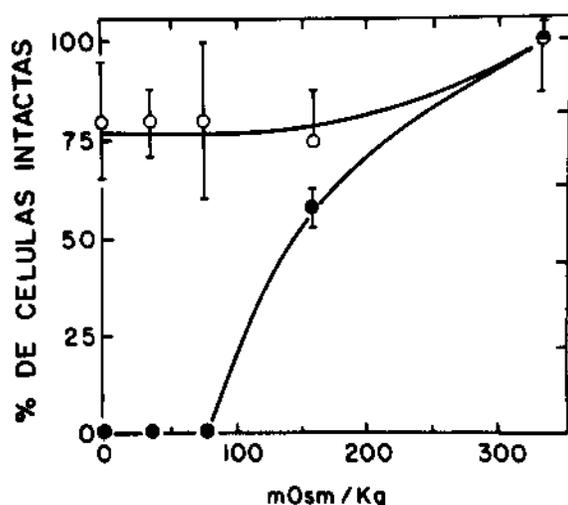


Figura 4. Resistencia de las amibas diferenciadas al choque hipotónico. Se suspendieron 1×10^5 trofozoítos (○) o amibas diferenciadas (●) en medio PEHPS diluido con diferentes volúmenes de agua bidestilada a 4°C por hora. Después de dicho tratamiento se determinó el porcentaje de amibas intactas con respecto al número de células incubadas en medio de cultivo sin diluir. Cada símbolo representa el promedio \pm DE de tres experimentos diferentes.

Relación entre la edad de los cultivos y el porcentaje de amibas diferenciadas y variables

Al analizar la relación entre el porcentaje de amibas diferenciadas y viables y la edad de los cultivos, se encontró que hasta el cuarto día de edad, durante la fase logarítmica de crecimiento, 98 por ciento de las amibas estaba viable -a juzgar por su capacidad para excluir eosina 1:10 000, disuelta en agua bidestilada- y tenían el

aspecto y la movilidad típicos de los trofozoítos. Al sexto día, durante la fase de desaceleración del crecimiento, 35 por ciento eran trofozoítos y el 65 por ciento restante de la población estaba constituido por amibas diferenciadas, de las cuales 15 por ciento estaban muertas. Al noveno día 96 por ciento de las amibas en los cultivos eran amibas diferenciadas, pero sólo 6 por ciento eran viables -fase de muerte- (Cuadro I).

Cuadro I

Diferenciación asincrónica de *E. histolytica* durante las fases de desaceleración del crecimiento y de muerte

Días de incubación	% de trofozoítos móviles	% de amibas ^a diferenciadas variables	% de amibas ^b diferenciadas muertas
6 ^c	35	50	15
7 ^d	21	18	61
8 ^d	9	16	75
9 ^d	4	6	90

^a Células esféricas, refringentes, de 15-20 μ m de diámetro, con escaso número de vesículas y vacuolas, capaces de excluir eosina 1: 10 000, analizadas con microscopio de contraste de fases.

^b Células incapaces de excluir eosina 1: 100 000.

^c Último día de la fase de desaceleración del crecimiento.

^d Fase de muerte.

Distribución de la frecuencia de los diámetros celulares de amibas procedentes de las fases logarítmica y desaceleración de crecimiento y de muerte

Todos los análisis de frecuencia correspondieron a curvas monomodales. El análisis de "t" de Student mostró que la distribución de los diámetros de los trofozoítos de la fase logarítmica, fue significativamente diferente al de las amibas de la fase de desaceleración del crecimiento y al de las amibas diferenciadas de 12 días de incubación ($p < 0.05$, en ambos casos). No hubo diferencias significativas entre las amibas de cultivos con 6 y 12 días de incubación, aunque entre las amibas de cultivos de seis días había trofozoítos con diámetros celulares considerablemente mayores que el de las amibas diferenciadas. Las modas de los diámetros fueron los siguientes: trofozoítos, 34 μ m; amibas en proceso de diferenciación y amibas diferenciadas de 6 y 12 días de incubación, 18 μ m en ambos casos (Fig. 5). Los diámetros promedio \pm DE fueron: trofozoítos $32.67 \pm 9.1 \mu$ m; amibas de cultivo de seis días $19.38 \pm 5.67 \mu$ m y de 12 días $18.27 \pm 4.11 \mu$ m.

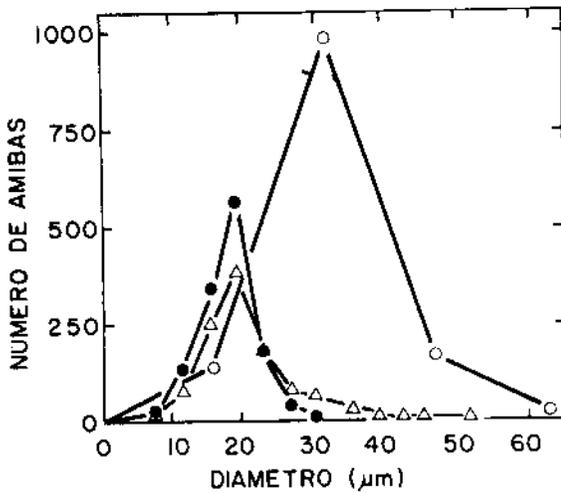


Figura 5. Curva de distribución de frecuencias de diámetros celulares. Estas fueron determinadas en amibas de cultivos de 3 días (preenfriadas a 4 °C y fijadas con glutaraldehído al 2.5 % en PBS), de 6 y 12 días de incubación, estando estas en la fase logarítmica de crecimiento (●), de desaceleración de crecimiento (△) o de muerte (○), respectivamente. Para ello se empleó un microscopio de contraste de fases, equipado con un micrometro (Zeiss), n = 1200 en cada caso.

Después de centrifugar los cultivos de seis días en un gradiente discontinuo de densidad 23 por ciento de las amibas fueron localizadas en las bandas de 30 y 40 por ciento de Percoll isotónico; 85 por ciento de ellas fluorescieron con luz ultravioleta en presencia de *Calcofluor White M2R*, Y 75 por ciento excluyeron a la eosina al 1:10 000. El análisis ultramicroscópico de ambas bandas mostró tres clases de células: 1) trofozoítos, con numerosas vesículas y vacuolas (Fig. 6A); 2) amibas en su etapa inicial de diferenciación, con una apariencia citoplásmica diferente, con pocas vesículas y vacuolas (Fig. 6A); 3) células con estas últimas características, y además, abundantes partículas ribonucleoproteicas helicoidales citoplásmicas (Fig.6C) y una delgada y discontinua estructura electrodensa sobre la membrana citoplásmica (Fig. 6 C-D). La figura 6B muestra un quiste inmaduro de *E. invadens*, con una pared incipiente y la apariencia característica del citoplasma quístico con vesículas y vacuolas semejantes a las de la amibas diferenciadas.

Discusión

Durante la fase de desaceleración del crecimiento y la fase de muerte, la mayor parte de las amibas de la cepa HK9, cultivadas en PEHPS, adquieren varias características, propias de los quistes:^{1,8} inmovilidad, forma

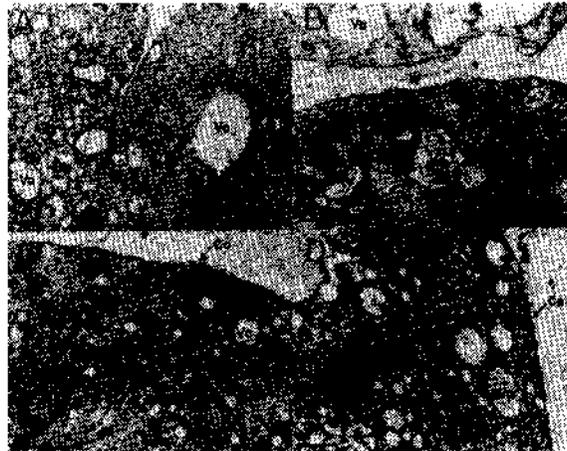


Figura 6. Ultraestructura de las amibas diferenciadas: recuadro A, amibas de la especie *E. histolytica*, la marcada con una T, trofozoíto y una célula en estado inicial de diferenciación (EDC). Esta última muestra una organización citoplásmica diferente a la del trofozoíto y vesículas (Ve) y vacuolas (Va) menores en tamaño y número. Recuadro B: trofozoítos y células en un estadio inicial de diferenciación de *E. invadens*. (C) segmento de una célula diferenciada con numerosas vesículas vacías, partículas helicoidales ribonucleoproteicas y una cubierta de fragmentos electrodensos alrededor de la membrana plasmática.

redonda, mayor refringencia (Fig.1), mayor proporción de células polinucleadas (manuscrito en proceso de publicación), menor diámetro (Figs. 1 y 5), menor número de vesículas y vacuolas (Figs. 1, 3 y 6) y menor densidad. Además de lo anterior, las amibas diferenciadas tienen una pared que muestra las siguientes analogías con la pared de los quistes naturales: a) resiste el choque hipotónico en agua bidestilada^{1,9-11} (Fig. 4) y el efecto del dodecilsulfato de sodio al 1 por ciento.¹ Esta última característica sugiere que las paredes de *E. histolytica* están constituidas, al menos parcialmente, por polisacáridos. La afinidad por el calcoflúor de la superficie de las amibas diferenciadas, que no se observa en los trofozoitos,¹ apoya dicha posibilidad. Arroyo Begovich ha sugerido que podría ser quitina.¹²

Las imágenes de la ultraestructura de las amibas diferenciadas de cultivos de seis días de incubación recuerdan a la de los quistes inmaduros de *E. invadens* (Fig. 6), la que aparece rodeando a la membrana plasmática como un material electrodenso discontinuo, pero no como una pared quística como un material electrodenso discontinuo, pero no como una pared quística típica e los quistes maduros de *E. histolytica* o de *E. invadens*.^{7,13} En cultivos de 12 días, la pared de las amibas diferenciadas no fue visualizada con microscopio electrónico de transmisión, pero se demostró por otras técnicas (Figs. 1-3). Ello podría deberse a que las amibas diferenciadas en medio PEHPS, bajo las condiciones estudiadas, producen una pared anormal, o a que esta se halla muy modificada en cultivos demasiado viejos, por efecto de enzimas producidas por las propias amibas,¹⁴⁻¹⁵ o de las hidrolasas presentes en el suero bovino,¹⁵ con el que se suplementa el medio de cultivo. De cualquier forma, los resultados del cuadro I sugieren fuertemente que todas las amibas sintetizan dicha estructura, y lo hacen de una manera asincrónica. Las partículas ribonucleoprotéicas intracitoplasmáticas, como las que ilustra la figura 6C, también aparecen frecuentemente en los quistes inmaduros de *E. invadens*, antes de que estas partículas se organicen como cuerpos cromatoides. Aunque usualmente hay trofozoitos con dos o más núcleos,¹⁶ el porcentaje de amibas polinucleadas es mayor que el de éstos, en poblaciones amibianas que tienen entre cuatro y ocho días de incubación (manuscrito enviado a publicación).

Todas las características antes mencionadas de las amibas diferenciadas, sugieren fuertemente que *E. histolytica*, cepa HK9, alcanza espontáneamente un estado de quiste inmaduro, en una forma asincrónica, aunque las evidencias presentadas aquí no excluyen la posibilidad de que una mínima parte de la población esté constituida por quistes maduros.

Algunas posibles causas que impiden la maduración masiva de los quistes cultivados en medio PEHPS son las siguientes; 1 durante su axenización o el largo período de subcultivo seriado por más de 20 años,⁵ la cepa HK9 pudo haber perdido parcialmente la información genética sobre su mecanismo de enquistamiento; 2 el PEHPS puede carecer de algunos de los factores de maduración o poseerlos en cantidad insuficiente; 3 el medio PEHPS puede contener sustancias tóxicas para los quistes inmaduros; 4 los quistes inmaduros podrían requerir condiciones específicas para madurar, que no se les proporcionaron en los experimentos aquí descritos.

Los requisitos de *E. histolytica* han sido encontrados en cultivos axénicos activados en el medio TPS-1,¹² pero éstos son raros, mientras que en PEHPS alcanzan un estado de diferenciación mayor y se encuentran en grandes cantidades, lo cual puede ser debido al efecto de algunos componentes del extracto de hígado y páncreas, el cual constituye la principal diferencia entre el TPS-1 y el PEHPS.³

El medio PEHPS y los quistes inmaduros que en este se forman espontáneamente, podrían ser herramientas muy útiles para analizar sistemáticamente las posibles causas que impiden la maduración masiva de *E. histolytica* en condiciones axénicas, lo cual permitirá la investigación de diversos temas relacionados con mecanismos de infección de *E. histolytica*, que se encuentran prácticamente inaccesibles hasta hoy.

Agradecimientos

Los autores agradecen al ingeniero Jorge Loredo Murphy, de Vitrotec, Monterrey, N. L., las facilidades otorgadas para efectuar los estudios morfológicos de las amibas diferenciadas con el microscopio electrónico de barrido; a la Unidad de Patología del Centro Médico de Occidente, IMSS, Guadalajara, Jal., las facilidades otorgadas para el uso del microscopio electrónico de transmisión; a la Q.B.P. Elba Rodríguez-Pérez, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, por su asistencia en la identificación, preparación y tinción con yodo de los quistes de *E. histolytica* en heces humanas; a las biólogas Susana Ramírez-Romo y Margarita Jáuregui Topete, de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS, Guadalajara, Jal., por su asistencia en los estudios de ultraestructura de los quistes naturales y de las amibas diferenciadas axénicas; y al doctor Antonio Luna de la Rosa, por su trabajo gráfico.

Este trabajo fue financiado parcialmente con fondos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Proyecto PVT/QF/NAL 85/3181.

Referencias

1. Kudo RR. Amoebida Ehrenberg. En: Protozoology. 5a ed Springfield: Charles C. Thomas Publisher, 1966: 518.
2. Martínez-Palomo A. Biochemistry. En: The biology of *Entamoeba histolytica*. New York: John Wiley & Sons, 1982: 56.
3. Said-Fernández S, Vargas-Villareal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G, Martí-

- nez-Rodríguez H. PEHPS medium: An alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 249.
4. Mata-Cárdenas BD, Said-Fernández S. Wall synthesis in axenic cultures of *Entamoeba histolytica* grown in PHEPS medium. *Arch Invest Med Mex* 1986; 17 (Supl 1): 25.
 5. Diamond LS. Techniques in axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*. *J Parasitol* 1968; 54: 1047.
 6. Meerovitch E. Some biological requirements and host-parasite relations of *Entamoeba invadens*. *Canad J Zool* 1958; 36: 513.
 7. Mora-Galindo J, González-Cisneros F, Feria-Velasco A. Ultrastructure of *Entamoeba invadens* cysts obtained under effect of emetine, tinidazole and rifampicin. *Arch Invest Med Mex* 1986; 17: 113.
 8. Avron B, Bracha R, Dutsch MR, Mirelman D. *Entamoeba invadens* and *Entamoeba histolytica*: Separation and purification of precysts and cysts by centrifugation of discontinuous density gradients of Percoll. *Exp Parasitol* 1983; 55: 265.
 9. Arroyo-Begovich A, Martínez-Palomo A, Sánchez-Pérez MA. Formación de la pared celular durante el enquistamiento de *E. invadens*. *Arch Invest Med Mex* 1978; 9 (Supl 1): 105.
 10. Arroyo-Begovich A, Cárabez-Trejo A, Ruiz-Herrera J. Composición de la pared celular de quistes de *Entamoeba invadens*. *Arch Invest Med Mex* 1979; 9 (Supl 1): 99.
 11. Arroyo-Begovich A, Cárabez-Trejo A, Ruiz-Herrera J. Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *J Parasitol* 1980; 66: 735.
 12. Arroyo-Begovich A, Cárabez-Trejo A, De la Torre M. Tinción de quistes de *Entamoeba invadens*, *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba coli* con aglutinina de germen de trigo marcada con partículas de oro coloidal. *Arch Invest Med Mex* 1980; 11 (Supl 1): 25.
 13. Chávez B, Martínez-Palomo A, De la Torre M. Estructura ultramicroscópica de la pared de quiste de *Entamoeba invadens*, *E. histolytica* y *E. Coli*. *Arch Invest Med Mex* 1978; 9:113.
 14. Pérez-Montfort R, Ostoa-Saloma P, Velázquez-Medina L, Montfort I, Becker I. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba invadens*. *Mol Biochem Parasitol* 1987; 26: 87.
 15. Lundblad G, Elander M, Lind J, Slettengreen K. Bovine serum chitinase. *Eur J Biochem* 1979; 100: 455.
 16. López-Revilla R, Gómez-Domínguez R. *Entamoeba histolytica*, *E. invadens* and *E. moshkowskii*: fluctuations of the DNA content of axenic trophozoites. *Exp Parasitol* 1978; 44: 243.
 17. Lowe Cy, Maegraith BG. Electron microscopy of axenic strain of *Entamoeba histolytica*. *Ann Trop Med Parasitol* 1970; 64: 293.

COMENTARIO OFICIAL

ANA FLISSER*

En 1928 Dobell describió el ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* en cultivos de la cepa K.28c obtenida de un mono. Según el propio autor no tenía pruebas suficientes de que la amiba aislada por él fuera la misma que la forma encontrada en humanos. Estudios realizados algunos años después por otros autores en *E. histolytica* aislada de humanos corroboraron los datos de Dobell.

* Académico numerario. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Hasta la fecha esta descripción sigue siendo válida. Prácticamente nada se le ha agregado a la descripción del ciclo de vida de *E. histolytica*.

El ciclo de vida *E. histolytica* supuestamente incluye cuatro etapas consecutivas: el trofozoito, el prequiste, el quiste y la amiba metaquística. Los trofozoitos se multiplican por fisión binaria y se enquistan produciendo quistes uninucleados y después tetranucleados. De cada quiste emerge una amiba metaquística tetranucleada que produce a su vez ocho trofozoitos uninucleados. En 1975 se logró la producción en el laboratorio de quistes de *E. invadens* por medio de metodología confiable y reproducible. El principal problema para el estudio del enquistamiento de *E. histolytica* es la ausencia de medios de cultivo óptimos para la producción de estas formas de resistencia en condiciones axénicas.

La contribución del doctor Said Fernández al estudio de la amibiasis es la producción de un nuevo medio llamado PEHPS para el cultivo axénico de *E. histolytica*, y su trabajo de ingreso describe con detalle quistes inmaduros de la cepa HK-9 producidos en cultivo. Las características de las amibas diferenciadas producidas en las investigaciones del doctor Said son similares a las de los quistes de *E. invadens* y a la de los quistes naturales de *E. histolytica*, lo que indica claramente que las amibas diferenciadas producidas en cultivo axénico en medio PEHPS son quistes de *E. histolytica*.

Los libros del doctor Martínez-Palomo publicados en 1982,¹ y en 1989,² sobre la biología de *E. histolytica* y la amibiasis, respectivamente, citan en la sección correspondiente a la descripción de los quistes que "la diferenciación de trofozoitos en quistes es uno de los aspectos menos conocidos de la biología de este parásito. Siendo el quiste la forma de resistencia que permite sobrevivir a las amibas en condiciones adversas fuera del tubo digestivo del hombre, es al mismo tiempo sorprendente y lamentable el poco interés que se ha dedicado a la investigación de este aspecto particular de la amibiasis. Este aparente poco interés deriva en parte de la incapacidad para producir diferenciación de trofozoitos a quistes en cultivos axénicos".

El trabajo de ingreso del doctor Said cumple otra etapa en el estudio de la amibiasis que permitirá analizar el enquistamiento de *E. histolytica in vitro*. Sea usted bienvenido a la Academia Nacional de Medicina.

Referencias

1. Martínez-Palomo A. The biology of *Entamoeba histolytica*. New York: Research Studies Press, Wiley & Sons LTD. 1982: 161.
2. Martínez-Palomo A. Amibiasis. México: Editorial Médica Panamericana, D. F. 1989; 206.

