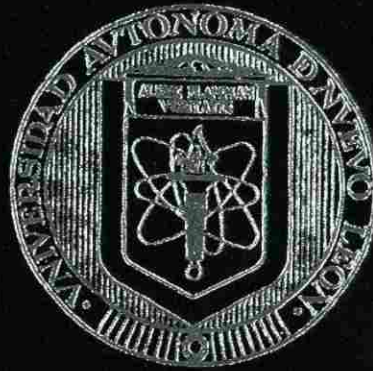


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INDUCCION *in vitro* DEL CICLO DE VIDA AXENICO DE
Entamoeba histolytica E. INHIBICION DE
SU DIFERENCIACION

Por

M.C. MARIA PORFIRIA BARRON GONZALEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIA
con Especialidad en Microbiología

Septiembre, 2007

M.P.B.G.

INDUCCION *in vitro* DEL CICLO DE VIDA AXENICO DE
INHIBICION E INHIBICION DE
SU DIFERENCIACION

TD
25320
FCB
2007
.B376

2007



1020160693



UANL

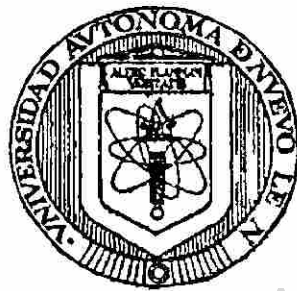
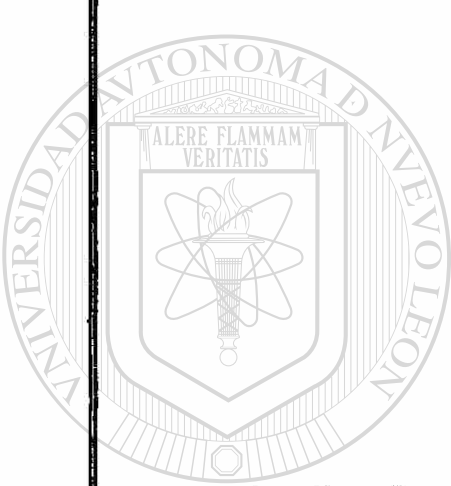
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**INDUCCIÓN *in vitro* DEL CICLO DE VIDA AXÉNICO DE
Entamoeba histolytica E INHIBICIÓN DE
SU DIFERENCIACIÓN**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS Por

M.C. MARÍA PORFIRIA BARRÓN GONZÁLEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en Microbiología**

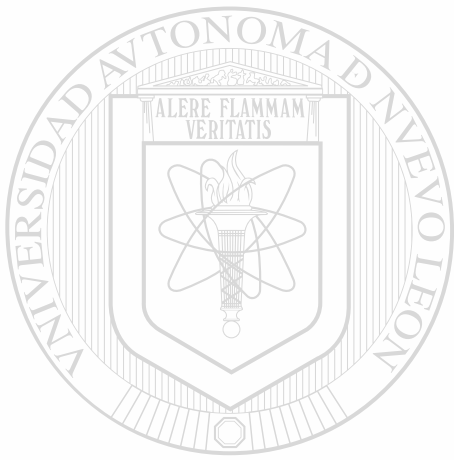
Septiembre, 2007

TD
253 n
CL

.R376



FONDO
TESIS
170908



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**INDUCCIÓN *in vitro* DEL CICLO DE VIDA AXÉNICO DE
Entamoeba histolytica E INHIBICIÓN DE
SU DIFERENCIACIÓN**

Por

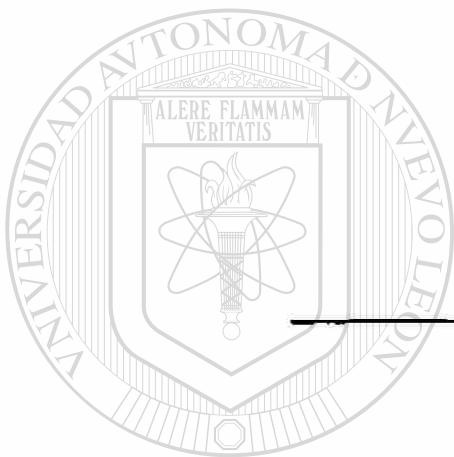
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M.C. MARÍA PORFIRIA BARRÓN GONZÁLEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en Microbiología

Septiembre, 2007


**INDUCCIÓN *in vitro* DEL CICLO DE VIDA AXÉNICO DE
Entamoeba histolytica E INHIBICIÓN DE
SU DIFERENCIACIÓN**




Comité de Tesis



Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta
Director




Dr. Benito David Mata Cárdenas
Director Externo



Dra. Licet Villarreal Treviño
Secretario



Dra. Diana Reséndez Pérez
Vocal



Dra. Carmina Calzado Flores
Vocal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INDUCCIÓN *in vitro* DEL CICLO DE VIDA AXÉNICO DE
***Entamoeba histolytica* E INHIBICIÓN DE**
SU DIFERENCIACIÓN

T E S I S

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en Microbiología

Presente

M.C. MARÍA PORFIRIA BARRÓN GONZÁLEZ
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS


Dr. Benito David Mata Cárdenas
Director Externo

Septiembre, 2007

DEDICATORIA

Al maestro de maestro



Con cariño a toda mi familia

UANL

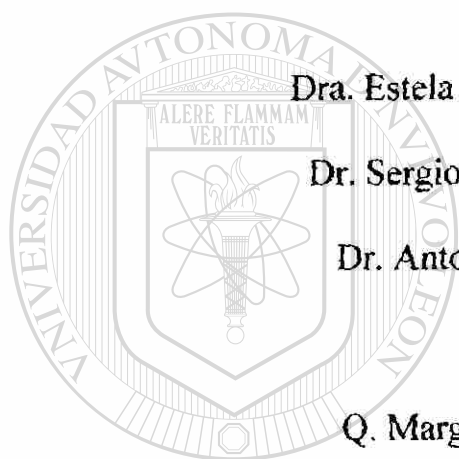
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A todos los forjadores quienes cimentaron uno a uno [®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

las columnas de nuestra Máxima Casa de Estudios:

la Universidad Autónoma de Nuevo León.

In memoria



Dra. Estela Flores de De la Garza

Dr. Sergio De la Garza Galván

Dr. Antonio Ayala Lozano

y

Q. Margarita De la Torre

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTO

Desarrollar y escribir esta tesis no consistió sólo en la labor de una servidora, deseo dar crédito a las personas e instituciones que me asistieron, inspiraron y alentaron.

En primer lugar deseo agradecer a la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Biológicas por estos años en que me han brindado el sustento y me han abierto las puertas de sus instalaciones para el desarrollo de esta tesis.

Agradezco al Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta la dirección y asesoría que pacientemente y de forma tan atinada ha tenido durante el desarrollo de este trabajo, además le agradezco infinitamente por brindarme su bondadosa amistad y distinguirme en compartir su excelsa calidad humano. Además siempre le estaré agradecida por haber aceptado dirigir mi tesis tanto de licenciatura, maestría así como doctoral.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Licet Villarreal Treviño, una persona y maestra tan especial para mí, principalmente por haberme permitido aprender desde que era alumna de licenciatura, la disciplina y respeto que se debe tener al trabajo de laboratorio, por aceptar formar parte de la comisión de tesis de licenciatura, maestría y doctoral, por brindarme su cálida amistad, por sus oportunos consejos, por estar siempre pendiente del avance de esta tesis y de mi persona, también le agradezco profundamente el ejemplo de vida que siempre me ha brindado.

Al Dr. Benito David Mata Cárdenas, le externo mis más sinceros agradecimientos por haber aceptado participar en la comisión de tesis tanto de licenciatura, maestría así como doctoral, por haberme compartido siempre su valiosa experiencia durante el desarrollo experimental, por infundirme confianza, por estar siempre pendiente de las necesidades para llevar a buen término este trabajo y así como por estar pendiente como parte de mi comité tutorial del avance de esta tesis.

A ustedes tres les agradezco el haberme acompañarme durante estos diez años en mi desarrollo profesional y juntos haber logrado éxitos en el trabajo en equipo que hemos realizado hasta ahora, gracias y que Dios los bendiga siempre.

También expreso mi gratitud a la Dra. Diana Reséndez Pérez por el apoyo que me ha brindado durante el desarrollo de esta tesis, especialmente en la parte experimental para la detección de proteínas en SDS-PAGE, así como por estar pendiente como parte de mi comité tutorial del avance de esta tesis y agradezco profundamente las observaciones realizadas para el mejor resultado en este trabajo, además le externo mi admiración por ser una mujer tan dedicada, profesional e exitosa.

Asimismo, doy gracias a la Dra. Carmina Carlota Calzado Flores el haber aceptado formar parte de la comisión de esta tesis, por estar al pendiente de los avances de este trabajo, por haberme proporcionado la muestra de *Castela texana* empleada en este trabajo y por brindarme siempre su amable amistad.

A ustedes cinco les agradezco por aceptar formar parte de la comisión de mi tesis doctoral y el valioso tiempo dedicado a la revisión del escrito de esta tesis así como las observaciones realizadas ¡muchas gracias y que Dios los bendiga!.

Agradezco enormemente a las siguientes instituciones y personas quienes colaboraron desinteresadamente para el desarrollo de esta tesis:

*A la empresa NEMAK, por permitirme el empleo de su microscopio electrónico de barrido y la asesoría técnica.

*A la empresa PEÑOLES, por permitirme el empleo de su microscopio electrónico de barrido y la asesoría técnica de las Q.I. Laurentina Villegas, María Lara y Nelly

*A la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica de la UANL, agradezco al Dr. Virgilio González, Dra. Claudia Guerra y Dr. Edgardo Reyes por su asesoría, confianza brindada y ayuda para obtener imágenes al microscopio de fuerza atómica de contacto. Asimismo a la Dra. Ana María Guzmán por permitirme el uso del equipo necesario y la asesoría para recubrir los especímenes con oro, cuantas veces fue necesario.

*A la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas, UANL; agradezco al Dr. Eduardo Pérez Tijerina y a su equipo de trabajo, por asesorarme y permitirme emplear su equipo para obtener las imágenes al microscopio de fuerza atómica de no-contacto.

*A la Facultad de Medicina de la UANL

- Depto. de Patología agradezco al Dr. Sepúlveda las facilidades prestadas para emplear las instalaciones de su laboratorio para procesar las muestras para MET, también agradezco profundamente el apoyo técnico por parte de la Q. Rosy para procesar las muestras.

*Al Hospital Universitario

- Depto. de Microscopía, agradezco la asesoría técnica y la ayuda por parte del Dr. Enrique Ramírez Bon para el uso del microscopio de fuerza atómica.
- Laboratorio del HU, por haberme proporcionado las muestras de heces fecales positivas para *E. histolytica* de pacientes diagnosticados con amibiasis.

*A la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL,

- Lab. de Microscopía agradezco al Dr. Jorge Piñero la asesoría y las facilidades brindadas para el revelado e impresión de las imágenes al MET.
- Lab. de Biología del Desarrollo agradezco a la Dra. Diana Reséndez Pérez el permitirme trabajar en su laboratorio, y al M.C. Claudio Moreno Rocha le agradezco la asesoría técnica para obtener las imágenes de fluorescencia durante el desenquistamiento de *E. histolytica*, también agradezco sinceramente a la MC. Jeaneth Salina Hernández y a la Cand. Dr. Diana Linda Cárdenas Chávez la ayuda y asesoría para realizar la determinación de proteínas de *E. histolytica* en SDS-PAGE.
- Al Departamento de Botánica, agradezco a la Dra. Teresa Torres Cepeda el permitirme el empleo del microscopio de fluorescencia para las diversas imágenes de fluorescencia mostradas en este trabajo.
- Al Laboratorio de Microbiología General.
Agradezco profundamente a la Dra. Licet Villarreal Treviño el permitimos realizar una parte de esta tesis en su laboratorio, asimismo a la M.C. Manuela Vela Franco por donarme las cepas de *E. coli* y *E. faecalis*, además le agradezco su generosa y noble amistad que siempre me ha brindado, por todo el apoyo personal y profesional que siempre me ha otorgado ¡gracias!

*Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste, del Instituto Mexicano del Seguro Social y a su personal en especial al Dr. Benito D. Mata Cárdenas, Dr. Javier Vargas Villarreal, Dr. Salador Saíd, Dra. Pilar Carranza Rosales por brindarme su apoyo.

Además agradezco a todos los integrantes del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas por formar un área de trabajo muy armoniosa, lo cual refleja la calidad humana de cada uno de los integrantes de este Departamento y todos aquellos que trabajan en esta área, gracias a: M.C. Gerardo Guajardo M., Dra. María Elena Rodríguez, Dr. Jesús Ángel de León, Dra. María Eufemia Morales Rubio, Dr. Jaime F. Neávez T. Dra. María Luisa Cárdenas Ávila, Dr. Fermín Mar Aguilar, Dr. Carlos Leal, M.C. Maribel Luna de Mar, Med. Ixchel Cuaranto, M.C. Karina Villanueva, QBP. Delia Carolina Reyna A. y todos los estudiantes del Dr. Jorge Armando Verduzco Martínez, Dra. Libertad Leal, MES. María Guadalupe Martínez, MES Ramón Cavazos, MES. María del Socorro Baez, MES Oralia González y Srita. Dulce Giovanna de la Torre por honrarme con su amistad, gracias a todos.

Agradezco también a todos los tesistas, becarios y alumnos de servicio social y PROVERICYT por permitirme aprender junto a ustedes, con cariño a: QBP Dinora Janeth Pérez Terrazas (gracias por tu amistad, por tu ejemplo de vida y gracias por ser tan linda persona siempre, que Dios te bendiga), QBP Cecilia Griselda Serrano Vázquez, Pas QBP Adán Villanueva, QBP Gabriela Guadalupe Balderrama Herrera, QBP Liliana Barrera Poblano, QBP Edith Morales, QBP Esther Casas Castellanos, QBP Yazmín L. Toríz Rodríguez, QBP Antonio C. Torres Flores, QBP Fátima

Gabriela Zamora Herrera, pas QBP Leslie Hilary Ontiveros Moreno y Pas QBP Saira Lizbeth Blanco Solano, pas QBP Ma. de la Luz Rodarte Guerrero y a la est, QBP Claudia D. Ánimas Adame.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Jorge Armando Verduzco Martínez por su gentil amistad, por el gran apoyo que siempre me ha brindado así mismo agradezco la amistad y apoyo de la Dra. Socorro Flores González, Dr. Javier Vargas Villarreal, Dr. José Antonio Heredia Rojas, Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco, Dra. María Guadalupe Martínez García y Dra. Pilar Carranza Rosales.

Un agradecimiento especial al Dr. Raúl Torres Zapata, por su amistad y su colaboración desinteresada al ayudarme a realizar y comprender el análisis Probit.

Agradezco a los directores de la Facultad de Ciencias Biológicas Dr. José Santos García Alvarado y al Dr. Juan Manuel Alcocer Gonzáles por las facilidades proporcionadas para llevar a cabo este trabajo.

También externo mi agradecimiento a la Dra. Julia Verde Stara, directora de la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, así como a quienes estuvieron al frente de la Subdirección de esta División durante el desarrollo de esta tesis, a la Dra. María Luisa Rodríguez Tovar y al Dr. Ricardo Gómez Flores y a quien funge actualmente al frente, la Dra. Diana Reséndez Pérez; también agradezco a la Srita. Carmen y a Yadira todas las atenciones brindadas.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, la beca proporcionada durante el desarrollo de este trabajo, registro no 179766.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en colaboración con el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular del Centro de Investigación Biomédica

del Noreste (CIBIN) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), bajo la dirección del Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

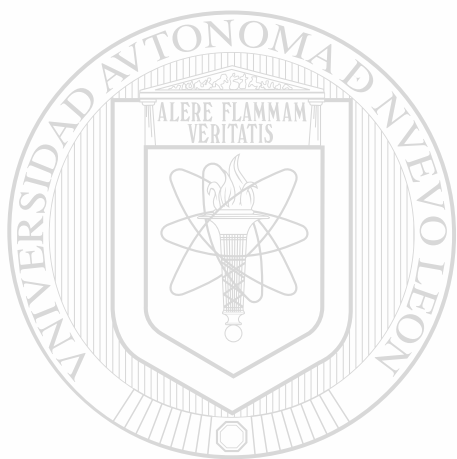
| Sección | Página |
|--|--------|
| DEDICATORIA | iii |
| AGRADECIMIENTOS. | v |
| LUGAR DE TRABAJO. | ix |
| LISTA DE TABLAS. | xv |
| LISTA DE FIGURAS. | xvi |
| LISTA DE SÍMBOLOS | xix |
| NOMENCLATURA. | xx |
| 1. RESUMEN | 1 |
| 1. ABSTRACT. | 2 |
| 2. INTRODUCCIÓN. | 3 |
| 3. HIPÓTESIS. | 5 |
| 4. OBJETIVOS. | 5 |
| 4.1 Objetivo general | 5 |
| 4.2 Objetivos particulares. | 5 |
| 5. ANTECEDENTES. | 6 |
| 5.1 Amibiasis | 6 |
| 5.2 Clasificación taxonómica | 7 |
| 5.3 Epidemiología | 7 |
| 5.4 Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> | 8 |
| 5.5 Biología celular y molecular de <i>Entamoeba histolytica</i> | 10 |
| 5.6 Métodos de cultivo y enquistamiento para <i>E. histolytica</i> | 11 |
| 5.6.1 Métodos de cultivo | 11 |
| 5.6.2 Métodos de enquistamiento. | 13 |
| 5.7 Pared celular de quistes de <i>Entamoeba</i> | 16 |
| 5.7.1 Composición | 16 |
| 5.7.2 Estructura | 16 |
| 5.8 Quitina | 17 |
| 5.8.1. Síntesis de quitina en pared celular de quistes de amibas. | 18 |
| 5.9 Desenquistamiento de <i>Entamoeba histolytica</i> | 19 |
| 5.10 Ultraestructura de trofozoítos y quistes de <i>Entamoeba</i> | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 5.11 Efecto de agentes químicos sobre el desenquistamiento <i>in vitro</i> de <i>Entamoeba</i> | 21 |
| 5.12 Importancia y Justificación | 23 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS | 24 |
| 6.1 Origen de los reactivos | 24 |
| 6.2 Material biológico | 25 |
| 6.2.1 Cepas de <i>Entamoeba</i> | 25 |
| 6.2.2 Cepas de enterobacterias | 25 |
| 6.2.3 Quistes de <i>Entamoeba histolytica</i> de pacientes con diagnóstico de amibiasis | 25 |
| 6.2.4 Suero bovino | 25 |
| 6.2.5 Bilis bovina | 25 |
| 6.2.6 Extracto metanólico de <i>Castela texana</i> | 25 |
| 6.3 Preparación de reactivos | 26 |
| 6.3.1 Acetato de uranilo | 26 |
| 6.3.2 Ácido clorhídrico 0.1N | 26 |
| 6.3.3 Alcohol ácido | 26 |
| 6.3.4 Alcohol al 70% | 26 |
| 6.3.5 Alcohol al 90% | 26 |
| 6.3.6 Alcohol yodado | 26 |
| 6.3.7 Azul de toluidina | 26 |
| 6.3.8 Azul Coomasie (Coomasie brilliant blue G) | 26 |
| 6.3.9 Buffer de carga 2X | 26 |
| 6.3.10 Buffer salino de fosfatos (PBS) | 26 |
| 6.3.11 Buffer de fosfatos 0.2 M pH=7.2 | 26 |
| 6.3.12 Carbol xilol | 26 |
| 6.3.13 Citrato de plomo | 27 |
| 6.3.14 Calcofluor M2r 1.0% | 27 |
| 6.3.15 Colorante tricrómico de Gomori | 27 |
| 6.3.16 Fijador (Solución de Shaudinn) | 27 |
| 6.3.17 Formalina al 10% | 27 |
| 6.3.18 Glutaraldehído al 2.5% | 27 |
| 6.3.19 Hidróxido de sodio 10N | 27 |
| 6.3.20 Histamina 0.6 mM | 27 |
| 6.3.21 Percoll (Sigma) | 27 |
| 6.3.22 Resina Spurr (Spurr., 1969) | 27 |
| 6.3.23 Sarkosil 0.15% | 27 |
| 6.3.24 Solución acuosa saturada de cloruro de mercurio | 28 |
| 6.3.25 Solución de hidróxido de sodio 1N | 28 |
| 6.3.26 Solución de penicilina-estreptomicina | 28 |
| 6.3.27 Solución salina fisiológica | 28 |
| 6.3.28 Solución decolorante | 28 |
| 6.3.29 Sulfato de zinc ($\delta=1.18$ g/mL) | 28 |

| | | |
|---------|---|----|
| 6.3.30 | Tetróxido de osmio OsO ₄ 1% | 28 |
| 6.3.31 | Tritón X-100 al 1% | 28 |
| 6.3.32 | Tris-glicina 5X (500 mL) | 28 |
| 6.3.33 | Yodo-lugol | 29 |
| 6.4 | Medio de cultivo | 29 |
| 6.4.1 | Preparación del medio TYI-S-33 | 29 |
| 6.5 | Métodos | 29 |
| 6.5.1 | Mantenimiento de <i>Entamoeba histolytica</i> | 29 |
| 6.5.2 | Cinéticas de crecimiento de <i>Entamoeba histolytica</i> | 29 |
| 6.5.3 | Obtención de quistes de <i>E. histolytica</i> a partir de heces fecales | 30 |
| 6.5.4 | Inducción de estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> bajo condiciones axénicas <i>in vitro</i> | 30 |
| 6.5.4.1 | Diseño experimental | 30 |
| 6.5.4.2 | Obtención de estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica in vitro</i> bajo condiciones axénicas | 33 |
| 6.5.4.3 | Cinética de inducción de estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica in vitro</i> bajo condiciones axénicas | 33 |
| 6.5.5 | Inducción del ciclo de vida axénico <i>in vitro</i> de <i>E. histolytica</i> | 34 |
| 6.5.6 | Separación por gradiente discontinuo de percoll | 35 |
| 6.5.7 | Tinciones | 36 |
| 6.5.7.1 | Pared celular (tinción especial) | 36 |
| 6.5.7.2 | Núcleos (tinción especial) | 36 |
| 6.5.7.3 | Citoplasma y núcleo (tinción diferencial) | 36 |
| 6.5.8 | Microscopía | 37 |
| 6.5.8.1 | Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) | 38 |
| 6.5.8.2 | Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) | 38 |
| 6.5.8.3 | Microscopía de Fuerza Atómica (MFA) de No-Contacto y Contacto Intermitente o Tapping | 39 |
| 6.6 | Análisis electroforéticos comparativos (SDS-PAGE) de los componentes protéicos de trofozoítos y de estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> | 41 |
| 6.7 | Extracción de RNA total amibiano por el método Trizol [®] | 42 |
| 6.8 | Determinación de la concentración inhibitoria media CI ₅₀ del metronidazol, cafeína, teofilina, NaF y extracto metanólico de <i>Castela texana</i> sobre <i>E. histolytica</i> | 43 |
| 6.8.1 | Efecto de agentes químicos sobre el enquistamiento de <i>E. histolytica</i> | 43 |
| 6.8.2 | Análisis estadístico | 44 |

| | |
|---|----|
| 7. RESULTADOS | 45 |
| 7.1 Cinética de crecimiento de <i>Entamoeba histolytica</i> <i>in vivo</i> | 45 |
| 7.2 Rendimiento de estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> obtenidas bajo condiciones axénicas <i>in vitro</i> | 46 |
| 7.3 Cinética de inducción de estructuras semejantes a quistes de <i>Entamoeba histolytica</i> <i>in vitro</i> bajo condiciones axénicas | 47 |
| 7.4 Desenquistamiento axénico <i>in vitro</i> de las estructuras semejantes a quistes de <i>Entamoeba histolytica</i> | 48 |
| 7.5 Inducción del ciclo de vida axénico de <i>Entamoeba histolytica</i> <i>in vivo</i> | 49 |
| 7.6 Morfología de los trofozoítos, quistes y estructuras semejantes a quistes de <i>Entamoeba histolytica</i> | 54 |
| 7.6.1 Tinciones | 54 |
| 7.6.1.1 Fluorescencia | 54 |
| 7.6.1.2 Tinción Tricrómica | 55 |
| 7.6.1.3 Tinción con yodo-lugol | 56 |
| 7.7 Análisis morfológico y topográfico de las estructuras semejantes a quistes de <i>Entamoeba histolytica</i> | 57 |
| 7.7.1 Análisis morfológico de las estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) | 57 |
| 7.7.2 Análisis topográfico de las estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> mediante Microscopía electrónica de Barrido | 61 |
| 7.7.2.1 Análisis semicuantitativo. | 64 |
| 7.7.3 Análisis topográfico de las estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> a través de Microscopía de fuerza atómica (MFA) | 64 |
| 7.7.3.1 MFA de contacto intermitente o tapping. | 65 |
| 7.7.3.2 MFA de No-contacto. | 66 |
| 7.8 Análisis electroforético comparativo SDS-PAGE de los componentes protéicos de trofozoítos y estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> | 67 |
| 7.9 Cuantificación del RNA total en trofozoítos y estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> | 68 |
| 7.10 Determinar la CI ₅₀ de la cafeína, extracto metanólico de <i>Castela texana</i> , teofilina, NaF y metronidazol en cultivos de <i>Entamoeba histolytica</i> | 69 |
| 7.11 Efecto del calcoflúor M2r, metronidazol, cafeína, teofilina, NaF y extracto metanólico de <i>Castela texana</i> sobre la inducción de estructuras semejantes a quistes de <i>Entamoeba histolytica</i> | 73 |

| | |
|--|-----|
| 8. DISCUSIONES | 74 |
| 9. CONCLUSIONES | 81 |
| 10. PERSPECTIVAS. | 82 |
| 11. LITERATURA CITADA | 83 |
| APENDICE TÉCNICO. | 94 |
| Anexo A Tablas-B PROBIT. | 94 |
| Anexo B Ecuaciones | 97 |
| Anexo C Análisis estadístico | 99 |
| Glosario | 101 |



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|---|---------------|
| I | Clasificación taxonómica de <i>E. histolytica</i> | 7 |
| II | Medios desarrollados para inducir el enquistamiento de <i>Entamoeba histolytica in vitro</i> | 15 |
| III | Inducción del desenquistamiento xénico <i>in vitro</i> de <i>E. histolytica</i> | 20 |
| IV | Origen de los reactivos | 24 |
| V | Composición del medio TYI-S-33 (Diamond, 1978). | 29 |
| VI | Bioensayos para inducir el enquistamiento de <i>Entamoeba histolytica</i> HM1-IMSS..... | 32 |
| VII | Composición del gel separador de poliacrilamida al 10% .. | 41 |
| VIII | Composición del gel concentrador al 5% | 41 |
| <hr/> | | |
| IX | Rendimiento de estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> obtenido en los diversos bioensayos..... | 46 |
| X | Descripción de los estadios del ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> obtenidos <i>in vitro</i> | 51 |
| XI | CI ₅₀ de diversos agentes sobre cultivos de <i>E. histolytica in vitro</i> | 72 |

LISTA DE FIGURAS

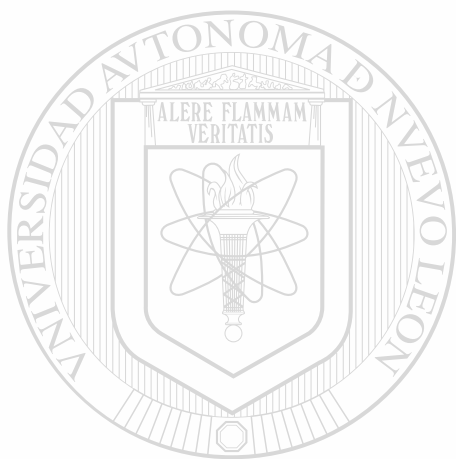
| Figura | Página |
|---|--------|
| 1. Estadios del ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> | 3 |
| 2. Distribución mundial de la amibiasis..... | 8 |
| 3. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> | 9 |
| 4. Estructura química de la quitina | 17 |
| 5. Sitios de acción de la cafeína, teofilina y NaF en el metabolismo del AMPc. | 23 |
| 6. Estrategia experimental para obtener estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> | 33 |
| 7. Separación de células por gradiente discontinuo de percoll..... | 35 |
| 8. Estrategia experimental general..... | 40 |
| <hr/> | |
| 9. Estrategia experimental para determinar el efecto de agentes químicos sobre el proceso de diferenciación de <i>E. histolytica in vitro</i> | 44 |
| 10. Cinética de crecimiento axénico de <i>E. histolytica in vitro</i> | 45 |
| 11. Cinética de inducción de estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica in vitro</i> | 47 |
| 12. Cinética de crecimiento de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> | 48 |
| 13. Método TGC7. | 49 |
| 14a. Ciclo de vida axénico <i>in vitro</i> de <i>Entamoeba histolytica</i> | 50 |
| 14b. Estadios del ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> | 53 |
| 14c. Ciclo de vida axénico de <i>E. histolytica in vitro</i> | 54 |

| | | |
|-----|--|----|
| 15. | Comparación del patrón de tinción con calcoflúor M2r. | 55 |
| 16. | Comparación del patrón de la tinción tricrómica. | 56 |
| 17. | Comparación del patrón de tinción con yodo-lugol. | 56 |
| 18. | Corte semifino de un trofozoito de <i>E. histolytica</i> | 57 |
| 19. | Corte semifino de una estructura semejante a quiste de <i>E. histolytica</i> | 57 |
| 20. | Micrografía electrónica de un trofozoito de <i>E. histolytica</i> | 58 |
| 21. | Micrografía electrónica de un trofozoito de <i>E. histolytica</i> | 59 |
| 22. | Micrografía electrónica de una porción de un trofozoito de <i>E. histolytica</i> | 59 |
| 23. | Micrografía electrónica de una sección de dos células de <i>E. histolytica</i> . . . | 60 |
| 24. | Micrografías electrónicas de una célula de <i>E. histolytica</i> | 61 |
| 25. | Aspecto de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> observados al MEB. | 62 |
| 26. | Agregado de estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> | 63 |
| 27. | Estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> | 63 |
| 28. | Estructura semejante a quiste de <i>E. histolytica</i> | 63 |
| 29. | Topografía de la pared celular (pc) de una estructura semejante a quiste de <i>E. histolytica</i> | 63 |
| 30. | Quistes de <i>Entamoeba invadens</i> | 63 |
| 31. | Topografía de un agregado de quistes de <i>E. histolytica</i> | 63 |
| 32. | Análisis semicuantitativo de la pared celular de una ESQ. | 64 |
| 33. | Análisis bidimensional de una estructura semejante a quiste de <i>E. histolytica</i> | 65 |
| 34. | Análisis topográfico de una estructura semejante a quiste de <i>E. histolytica</i> | 66 |

| | | |
|-----|--|----|
| 35. | Análisis topográfico de una estructura semejante a quiste de <i>E. histolytica</i> a través de microscopía de fuerza atómica de No-contacto. | 66 |
| 36. | Patrón electroforético de proteínas totales de <i>E. histolytica</i> | 67 |
| 37. | Cuantificación de RNA total en trofozoítos y estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> | 68 |
| 38. | Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de RNA total. | 69 |
| 39. | Diagrama de dispersión de las variables Yi probit y log Xi del bioensayo de teofilina sobre cultivos de <i>E. histolytica</i> | 70 |
| 40. | Diagrama de dispersión de las variables Yi probit y log Xi del bioensayo de fluoruro de sodio (NaF) sobre cultivos de <i>E. histolytica</i> | 70 |
| 41. | Diagrama de dispersión de las variables Yi probit y log Xi del bioensayo de la cafeína sobre cultivos de <i>E. histolytica</i> | 71 |
| 42. | Diagrama de dispersión de las variables Yi probit y log Xi del bioensayo del metronidazol sobre cultivos de <i>E. histolytica</i> | 71 |
| 43. | Diagrama de dispersión de las variables Yi probit y log Xi del bioensayo del extracto metabólico de <i>Castela texana</i> sobre cultivos de <i>E. histolytica</i> | 72 |
| 44. | Evaluación de la acción de agentes químicos sobre la inducción de estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i> | 73 |
| 45. | Morfología diversa de quistes de <i>E. histoytica</i> | 75 |
| 46. | Quiste y pared celular de <i>E. histolytica</i> | 76 |
| 47. | Quistes de <i>E. histolytica</i> | 78 |
| 48. | Quistes de <i>E. invadens</i> | 78 |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----|------------------|
| Å | Angstrom |
| X | Aumentos |
| β | Beta |
| ∅ | Centrifugación |
| [] | Concentración |
| δ | Densidad |
| = | Igual |
| λ | Longitud de Onda |
| ® | Marca registrada |
| < | Menor |



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

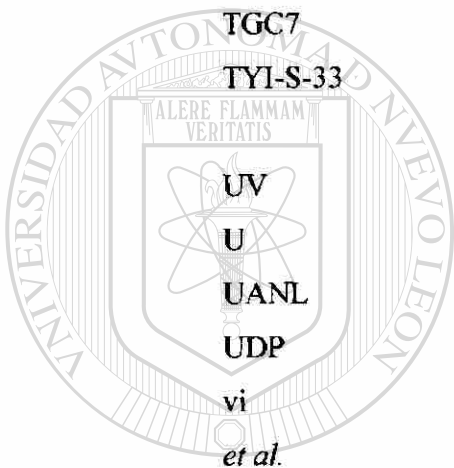
| | |
|---|--------------|
| μ | Micro/ Micra |
| - | Negativo |
| + | Positivo |
| % | Porcentaje |

NOMENCLATURA

| | |
|------------------|---|
| AMPc | 5'3'-Adenosín monofosfato cíclico |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| EDTA | Ácido etilen diaminotetra-acético |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNA _m | Ácido ribonucleico mensajero |
| RNA _r | Ácido ribonucleico ribosomal |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| ANOVA | Análisis de Varianza |
| NSA | Anhídrido nonenil succínico |
| PBS | Buffer salino de fosfatos |
| cm | Centímetro |
| CIBIN | Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste |
| CIBIO | Centro de Investigaciones Biomédicas del Occidente |
| <hr/> | |
| Cols. | Colaboradores |
| CI ₅₀ | Concentración inhibitoria de la mitad de la población |
| mM | Concentración milimolar |
| N | Concentración Normal |
| D(+) | Configuración D (serie D), Dextrogiro |
| L(-) | Configuración L (serie L), Levogiro |
| civ | Cuerpos intravacuolares |
| DEPC | Dietil piro carbonato |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida en Dodecil sulfato de sodio |
| ESQ | Estructuras semejantes a quistes |

| | |
|------------------|--|
| Fig. | Figura |
| Figs. | Figuras |
| °C | Grados centígrados o Celsius |
| g | Gramo |
| g/mL | Gramo por mililitro |
| h. | Horas |
| IMSS | Instituto Mexicano del Seguro Social |
| ININ | Instituto Nacional de Irradiación Nuclear |
| Co ⁺² | Ion cobalto |
| kDa | Kilodaltones |
| Kg | Kilogramos |
| Lb. | Libra |
| L. | Litro |
| Log | Logaritmo |
| µg | Microgramos |
| µm | Micrómetro |
| MFA | Microscopio de Fuerza Atómica |
| MEB o SEM | Microscopio Electrónico de Barrido |
| MET | Microscopio Electrónico de Transmisión |
| mg | Miligramo |
| mL. | Mililitro |
| min | Minuto (s) |
| M | Molar |
| N.L. | Nuevo León |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| Pb | Pares bases |
| PEHPS | Peptona-Extracto de Hígado-Páncreas-Suero (Medio para cultivo de <i>E. histolytica</i>) |

| | |
|----------|---|
| APS | Persulfato de amonio |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| Chs-1 | Quitin sintetasa-1 |
| EhCHS1 | Quitin sintetasa-1 en <i>Entamoeba histolytica</i> |
| EhCHS2 | Quitin sintetasa-2 en <i>Entamoeba histolytica</i> |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| seg | Segundos |
| TEMED | Tetramethylethylenediamine |
| TGC7 | TYI+Glucosa+CO ₂ + 7 días. |
| TYI-S-33 | Tripticasa-Extracto de Levadura-Suero (Medio para cultivo de <i>Entamoeba histolytica</i>) |
| UV | Ultravioleta |
| U | Unidades |
| UANL | Universidad Autónoma de Nuevo León. |
| UDP | Uridin-Difosfato |
| vi | Vesículas intravacuolares |
| et al. | Y colaboradores |



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



1. RESUMEN

La amibiasis es una infección parasitaria causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. Representa una de las tres primeras causas de muerte por parásitos a nivel mundial, superada sólo por la malaria y la esquistosomiasis. La amibiasis afecta aproximadamente 50 millones de personas cada año, ocasionando cerca de 100,000 muertes. El ciclo de vida de *E. histolytica* presenta dos fases, el trofozoíto es la fase invasiva y la más estudiada en tanto que el quiste es la fase infectiva y menos estudiada debido a la imposibilidad de obtenerlo *in vitro*. En este trabajo nos planteamos el objetivo de inducir el ciclo de vida axénico *in vitro* de *E. histolytica* e inhibir su diferenciación empleando NaF, teofilina, cafeína, metronidazol y el extracto metanólico de *Castela texana*. Para este propósito se desarrolló una metodología para inducir la formación de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. El método denominado TGC7 consistió en inocular trofozoítos en muy buen estado en el medio TYI-S-33 glucosado y gaseado con CO₂ por 2 min, e incubados a 37°C por 7 días. Las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* obtenidas en este trabajo muestran las siguientes características: se encuentran en agregados, son estructuras esféricas, son resistentes al tritón X-100/30 min al 0.15%, al microscopio de UV en presencia de calcoflúor M2r al 10% emitieron fluorescencia intensamente, en cortes semifinos vistos al MET las estructuras semejantes a quistes presentaron multinucleación con cromatina condensada unida a la membrana nuclear, contiene grandes vacuolas en el citoplasma y presenta una delgada pared celular. La topografía de las estructuras semejantes a quistes observadas al MEB y al microscopio de fuerza atómica muestra que estas estructuras quísticas están bordeadas por una cubierta de bordes irregulares. Para inducir el ciclo de vida axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, las estructuras semejantes a quistes resistentes al tritón X-100 al 0.0001% por 30 min, fueron inoculadas en el medio TYI-S-33 y una nueva población de trofozoítos de *E. histolytica* fue obtenida. El proceso de desenquistamiento fue asincrónico. Por otra parte, se determinó la CI₅₀ del NaF, teofilina, cafeína, metronidazol y el extracto metanólico de *Castela texana* sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*; posteriormente se evaluó la concentración correspondiente al CI₅₀ de cada agente químico sobre el proceso de inducción de estructuras semejantes a quistes, los agentes químicos que presentaron mayor actividad inhibitoria sobre la inducción de estructuras semejantes a quistes fueron respectivamente el metronidazol, calcoflúor M2r y el extracto metanólico de *Castela texana*. No se observó diferencia significativa de los otros tratamientos con respecto al control.

contra la amibiasis; en otros trabajos reportan el hallazgo de daño neurológico en humanos (Schaumburg *et al.*, 1983), así como también existen trabajos que evidencian la resistencia *in vitro* que desarrolla *E. histolytica* a esta droga (Thepsuparungsikul *et al.*, 1971), por lo que es inminente la búsqueda de nuevos antiamibianos ya sea que actúen sobre trofozoítos o que interfieran con el proceso de diferenciación a quiste.

Se ha reportado una serie de agentes químicos que actúan en el proceso de crecimiento y diferenciación de algunos eucariotes unicelulares como *Hartmannella culbertsoni*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma lewisi*, *Dictyostelium discoideum* y *Entamoeba invadens*, estos agentes químicos evaluados son NaF, L-epinefrina y 2-hidroxitiramina (dopamina) los cuales son considerados estimuladores de la adenilil ciclasa, así como cafeína y teofilina son considerados inhibidores de la fosfodiesterasa del AMPc (Valdez *et al.*, 2000). Si bien el AMPc o 3'.5'-adenosin monofosfato cíclico tiene un papel importante en el control del crecimiento de células en cultivo; la cafeína y la teofilina, agentes inhibidores de la fosfodiesterasa del AMPc, disminuyen el crecimiento de las células BHK (Burk, 1968) por otra parte se ha reportado que la teofilina induce el enquistamiento de *Hartmannella culbertsoni* (Verna *et al.*, 1974), al emplear estas drogas aumentan los niveles de AMPc debido a la inhibición de la actividad de la fosfodiesterasa del AMPc. También se han encontrado evidencias de que el AMPc controla gran variedad de funciones en los hongos, tales como la utilización de fuentes exógenas de carbono, la conidiación, el dimorfismo sexual y el fototropismo (Pall, 1981).

En *Dictyostelium discoideum* cuando los nutrientes son escasos, estas amibas tienden a agruparse inducidos por la concentración de AMPc extracelular, el cual forma centros de agregación y es vertido al medio por las amibas; es entonces que se forman pseudoplasmodios hasta transformarse en un cuerpo fructífero (Gerish, 1987). En *Trypanosoma lewisi* el AMPc juega un papel muy importante en el proceso de diferenciación ya que pasa de su fase reproducible no infectiva, a otra no reproducible e infectiva; lo cual es inducido por la acción de los anticuerpos generados en el hospedero, con un aumento considerable en los niveles de AMPc (Strickler y Patton, 1975). En *Entamoeba invadens* se ha reportado inhibición tanto del crecimiento como de la diferenciación al emplear NaF a 5 y 10 mM ya que el NaF estimula la adenilil ciclasa de manera independiente de las proteínas G de membrana (Valdez *et al.*, 2000). Por otra parte el proceso de enquistamiento de *E. invadens* se ha visto disminuido al emplear extracto metanólico de *Castela texana* en el medio de enquistamiento (Calzado *et al.*, 2007).

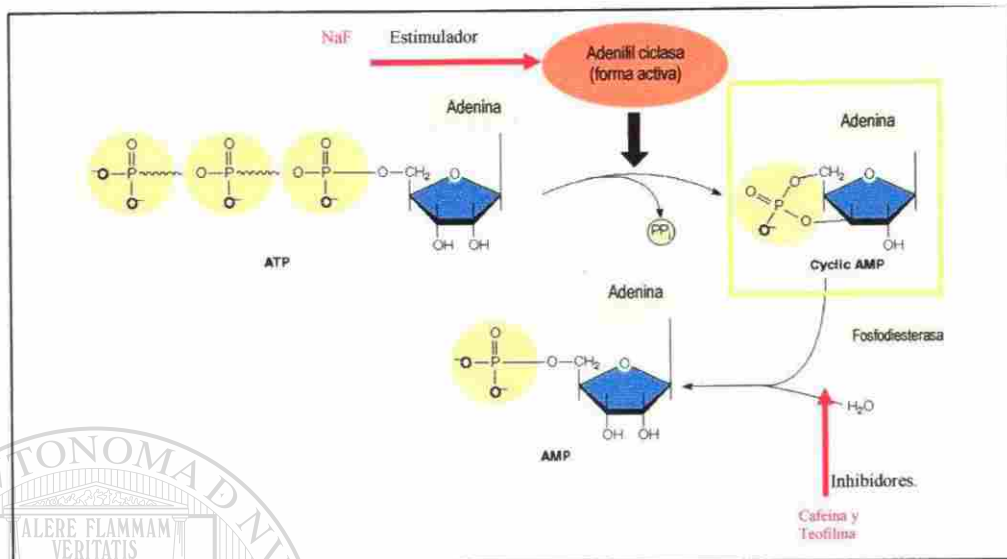


Figura 5. Sitios de acción de la cafeína, teofilina y NaF en el metabolismo del AMPc. La síntesis del AMPc es inducido por la adenililciclase la cual es estimulada por el NaF, en tanto que es degradada por la fosfodiesterasa, la cual es inhibida por la cafeína y la teofilina.

5.12. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud cataloga a la amibiasis como la tercer causa de muerte por parásitos protozoarios, anualmente más de 100 mil muertes y alrededor de 50 millones de casos de amibiasis son reportados por los organismos de salud en el mundo. A la fecha la droga de elección para el tratamiento de la amibiasis y sus múltiples manifestaciones clínicas es el metronidazol, sin embargo presenta la desventaja de presentar efectos secundarios indeseables en el humano y además existen reportes recientes de que algunas cepas de *E. histolytica* presenta resistencia a esta droga, aunado a otros reportes que muestran actividad mutagénica y carcinogénica. Además se desconocen los mecanismos involucrados en la patogenicidad de *E. histolytica*, así como aquellos involucrados en el desarrollo del ciclo de vida de *E. histolytica*, debido principalmente a que no se cuenta con un medio o método que permita obtener el estadio de quiste de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro* y de esta manera poder realizar estudios encaminados al desarrollo del ciclo de vida de *E. histolytica*, por lo cual en este trabajo planteamos la posibilidad de desarrollar un medio o método que permita obtener bajo condiciones axénicas el ciclo de vida de *Entamoeba histolytica in vitro*.

Por otra parte, hasta ahora no existe reporte alguno acerca del empleo de agentes químicos que actúen sobre el proceso de enquistamiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, por lo cual los resultados que se obtengan en este trabajo podrán ser empleados en investigaciones futuras encaminadas al control de la amibiasis a nivel de hospedero y del ambiente.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 ORIGEN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos empleados en el desarrollo de trabajo fueron grado reactivo y son provenientes de las casas comerciales especificadas en la Tabla IV.

Tabla IV
Origen de los reactivos

| Reactivo | Casa comercial |
|--|--|
| Peptona de caseína Extracto de levadura D(+)-Glucosa | Bioxon de México |
| Acido ascórbico L-cisteína Fosfato de potasio dibásico Metronidazol | Sigma Chemical Company (St. Louis Mo, USA) |
| Acetona Etanol N-Lauroylsarcosine (Sodium N-dodecanoyl-N-methylglycinate). Eter etílico Histamina Caldo nutritivo Glutaraldehído Formaldehído Resina Spurr y Entellan Colorante DAPI Sulfato de zinc | Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V. |
| Fosfato de potasio monobásico Hidróxido de sodio Ácido clorhídrico Cloruro de sodio Citrato férrico de amonio | Productos Químicos Monterrey, S.A. de C.V. |
| Penicilina G-sódica (Pengesod) Sulfato de estreptomina Sulfestrept Yodo lugol Percoll y calcoflúor M2r | Proveedora Química y Hospitalaria |

6.2 MATERIAL BIOLÓGICO

6.2.1 Cepas de *Entamoeba*

En este trabajo se utilizó la cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica*, la cual se encuentra en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

La cepa IP-1 de *Entamoeba invadens* fue donada por el Dr. Juan Mora Galindo del Centro de Investigaciones Biomédicas del Occidente (CIBIO).

6.2.2 Cepas de enterobacterias. En este trabajo se emplearon las enterobacterias *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*, las cuales amablemente fueron donadas por la M.C. María Manuela Vela Franco y por la Dra. Licet Villarreal Treviño del Laboratorio de Microbiología General del Departamento de Microbiología e Inmunología de esta Facultad.

6.2.3 Quistes de *Entamoeba histolytica* de pacientes con diagnóstico de amibiasis. De diferentes clínicas de seguridad social del IMSS ubicadas en el área metropolitana de Monterrey, N. L. y del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se obtuvieron muestras fijadas de heces fecales de pacientes diagnosticados positivos para *E. histolytica*.

6.2.4 Suero bovino. El suero bovino empleado en este trabajo se obtuvo a partir de sangre de bovino recién sacrificado en el Rastro de Monterrey; se dejó coagular por 6 h a 4°C, se separó por centrifugación (5,000 rpm durante 15 min.) el suero del coágulo, posteriormente se filtró con papel Whatman No. 1 y se esterilizó a 2 KGy en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) y se almacenó a -70°C. A un mes de utilizarse se almacenó a -20°C, posteriormente se descongeló a temperatura ambiente, posteriormente se descomplementó a 56°C/30 min agitándolo suavemente cada 5 min, posteriormente se le realizó prueba de esterilidad transfiriendo asépticamente 10 mL de este suero a tres tubos estériles de borosilicato con tapón de rosca y se incubaron a 37°C por 72 h, una vez corroborada su esterilidad se almacenó a -20°C hasta el momento de su empleo.

6.2.5 Bilis bovina. Se pesaron 0.5g de bilis bovina (Sigma), se diluyeron en 10 mL de PBS, se esterilizó con filtros millipore de 0.22µm y se almacenó a -20°C hasta su empleo.

6.2.6 Extracto metanólico de *Castela texana*. Este extracto fue amablemente donado por la Dra. Carmina Carlota Calzado Flores, del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste (CIBIN).

6.3 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- 6.3.1 Acetato de uranilo.** Se pesaron 2.5 g de acetato de uranilo y se disolvieron en 50 mL de etanol al 50%. La solución se almacenó a 4°C protegido de la luz.
- 6.3.2 Ácido clorhídrico 0.1N.** Se diluyeron 0.41 mL de HCl concentrado (12N) en 50 mL de agua destilada.
- 6.3.3 Alcohol ácido.** Se pesaron 0.45 mL de ácido acético y se aforaron a 100 mL con alcohol etílico.
- 6.3.4 Alcohol al 70%.** Se tomaron 70 mL de alcohol etílico absoluto y se aforaron a 100 mL con agua destilada.
- 6.3.5 Alcohol al 90%.** Se tomaron 90 mL de alcohol etílico absoluto y se aforaron a 100 mL con agua destilada.
- 6.3.6 Alcohol yodado.** A 100 mL de alcohol etílico al 70% se le agregaron 10 g de cristales de yodo, para obtener una solución café-oscura.
- 6.3.7 Azul de toluidina.** Se disolvió 1 g de borato de sodio en 100 mL de agua destilada en ebullición y se agregaron 0.5 g de azul de toluidina hasta disolver completamente, se filtró y se utilizó.
- 6.3.8 Azul de Coomasie (Coomassie brilliant blue G).** Se pesó 1.25g de azul de Coomasie, se agregaron 227 mL de metanol, 46 mL de ácido acético y se aforó a 500 mL.
- 6.3.9 Buffer de carga 2X.** Mezclar Tris-HCl 100 mM pH=6.8, SDS 1%, betamercaptoethanol al 4%, Coomasie brilliant blue G 0.02% y glicerol 24%.
- 6.3.10 Buffer salino de fosfatos (PBS).** Se pesaron 8 g de NaCl, 1.44 de K₂HPO₄, 0.24 de KH₂PO₄ y 0.2 g de KCl, se disolvieron en 1000 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 7.4, posteriormente se alicuotaron de manera conveniente para esterilizarse por autoclave a 121°C/15 min.
- 6.3.11 Buffer de fosfatos 0.2M, pH=7.2.** Se prepararon las siguientes soluciones de trabajo.
- Solución A: Se disolvieron 27.8g de K₂HPO₄ en 1000 mL de agua destilada.
 - Solución B: Se disolvieron 53.65g de KH₂PO₄ en 1000 mL de agua destilada.
 - Mezclar 28 mL de la solución A con 72 mL de la solución B para obtener un volumen final de 100 mL y un pH de 7.2.
- 6.3.12 Carbol-xilol.** A tres volúmenes de xilol se le añadió un volumen de fenol.

6.3.13 Citrato de plomo. Se preparó una solución inicial con 9 mL de agua descarbonatada y 1 mL de solución NaOH 1N, en la que se disolvieron 0.03g de citrato de plomo. Se guardó en refrigeración en recipiente ámbar.

6.3.14 Calcoflúor M2r 1.0%. Se pesó 0.1 g de calcoflúor y se aforó a 10 mL con agua destilada.

6.3.15 Colorante tricrómico de Gomori. Se pesaron 0.6g de cromotrofo 2R, 0.15g de verde claro SF, 0.15g de verde rápido FCF, se mezclaron los colorantes con 0.1 mL de ácido acético glacial, se dejaron reposar 30min, enseguida se disolvieron en 100 mL de agua destilada (se usa sin diluir).

6.3.16 Fijador (solución de Shaudinn). Se toma 1 volumen de alcohol etílico al 95%, y se toman 2 volúmenes de la solución acuosa saturada de cloruro de mercurio; antes de su uso se añaden 5 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL de solución.

6.3.17 Formalina al 10%. Se mezclaron 9 partes de agua destilada y una parte de formaldehído comercial (37-40%) a temperatura ambiente. Para preservar quistes, por cada parte de la muestra se agregaron 5 partes de formalina al 10%.

6.3.18 Glutaraldehído al 2.5%. Se disolvió el contenido de un frasco ampula con 1 mL de glutaraldehído al 25% en 90 mL de buffer de fosfatos 0.2M, pH 7.2 para obtener una solución final al 2.5%.

6.3.19 Hidóxido de sodio 10 N. Se disolvieron 40 g de NaOH en 100 mL de agua destilada

6.3.20 Histamina 0.6 mM. Se disolvieron 0.05 mg de histamina en 25 mL de agua bidestilada desionizada.

6.3.21 Percoll (Sigma). A la solución stock de Percoll (100%), se le ajustó la osmolaridad a 230 mOsm/Kg H₂O adicionando una parte de PBS 10X a nueve partes de Percoll, diluciones posteriores se realizaron en solución salina y se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.3.22 Resina Spurr (Spurr, 1969). Se pesaron 10g de dióxido de vinil ciclohexano, 6g de éter de propilenglicol diglicidil (DER), 26g de anhídrido nenenil succínico (NSA) y 0.4g de dimetil aminoetanol (DMAE). Los componentes se mezclaron evitando que se formaran burbujas.

6.3.23 Sarcosyl 0.15%. Se pesaron 0.15g de sarcosyl y se aforaron a 100 mL con agua destilada.

6.3.24 Solución acuosa saturada de cloruro de mercurio. Se pesaron 140 g de cristales de cloruro de mercurio, se disolvieron en 1 L de agua destilada. Se disuelve el cloruro de mercurio en el agua por calentamiento, se deja enfriar la mezcla. El exceso de cloruro de mercurio se decantó y se filtro la solución sobrenadante con papel Watman No.1, la solución transparente se guardó en un frasco de vidrio con tapón.

6.3.25 Solución de hidóxido de sodio 1 N. Se disolvió 0.01g de NaOH en 2.5 mL de agua descarboarbonatada.

6.3.26 Solución de penicilina-estreptomina

a) solución concentrada de penicilina: A un frasco ampula de 1,000,000 U de Penicilina-G sódica cristalina, se le inyectaron 5.0 mL de agua bidestilada estéril con aguja y jeringa estéril para disolver la penicilina.

b) solución patrón de penicilina-estreptomina: A un frasco ampula de sulfato de estreptomina, se le añadieron bajo condiciones de esterilidad, la solución concentrada de penicilina y se mezclaron.

c) solución de trabajo de penicilina-estreptomina (1000 X): Se transfirió asepticamente toda la solución patrón de penicilina-estreptomina del frasco ampula en una probeta estéril de 25 mL y se aforó a 20 mL con agua bidestilada estéril. Se almacenó a -20°C en alícuotas de 5 mL en tubos de 13 x 100 mm. cubiertos con papel aluminio.

6.3.27 Solución salina fisiológica. Se disolvieron 0.85 g de NaCl en 100 mL de agua destilada

6.3.28 Solución decolorante. Se mezclaron 25 mL de metanol, 35 mL de ácido acético y se aforaron a 500 mL. Se almacenó a temperatura ambiente

6.3.29 Sulfato de zinc ($\delta=1.18$ g/mL). Se disolvieron 331g de ZnSO₄ en un litro de agua destilada tibia, se filtró en papel Watman No.1, posteriormente se determinó la densidad, en caso de que esta sea inferior a 1.18 g/mL, se añadió más ZnSO₄, y cuando el valor fue mayor se agregó agua). Para muestras fijadas con formalina se preparó a una densidad de 1.20 g/mL.

6.3.30 Tetróxido de osmio OsO₄ 1%. Se disolvieron 0.25 g de OsO₄ en 25 mL de buffer de fosfatos 0.12 M quedando a una concentración final de 1%

6.3.31 Tritón X-100 al 1%. Se disolvió 1.0 mL de tritón X-100 en agua destilada y se aforó a 100 mL.

6.3.32 Tris-glicina 5X (500 mL). Se pesaron 7.55 g de Tris base, 47.0 g de glicina, se mezclaron con SDS al 10% y se aforó a 25 mL.

6.3.33 Yodo-lugol. Se pesaron 5.0 g de yodo, 10 g de yoduro de potasio y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.

6.4 MEDIO DE CULTIVO

6.4.1 Preparación del medio TYI-S-33

Se mezclaron todos los componentes descritos en la Tabla V, se disolvieron en agua desionizada. El medio se ajustó a pH 7.0 con NaOH 10N, se hicieron alícuotas de 10 mL en tubos de borosilicato de 16 x 125 mm con tapón de rosca, y se procedió a esterilizar por calor húmedo a 121°C/15Lb/15min., se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se les realizó prueba de esterilidad a 37°C/24 h y se almacenaron a congelación hasta su empleo.

Tabla V
Composición del medio TYI-S-33 (Diamond, 1978)

| COMPONENTES | CONCENTRACIÓN g/500 mL de agua desionizada |
|---------------------------------|--|
| Peptona de caseína | 10.00 |
| Extracto de levaduras | 5.00 |
| NaCl | 1.00 |
| L-cisteína | 0.50 |
| Ácido ascórbico | 0.10 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.50 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.30 |
| Citrato férrico de amonio | 0.00114 |
| D-glucosa anhidra | 5.0 |

6.5 MÉTODOS

6.5.1 Mantenimiento de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS

Se realizaron resiembras de 2×10^4 cel/mL tanto en el medio TYI-S-33, contenido en tubos de borosilicato de 16X150 con tapón de rosca, agregando a cada tubo 1 mL de suero, 0.1mL de solución penicilina-estreptomicina (1000 X) y posteriormente se incubaron a 37°C durante 72 h.

6.5.2 Cinéticas de crecimiento de *Entamoeba histolytica*

Se enfrió el tubo fuente de inóculo a 0-4°C/15 min, se determinó el número de células/mL, se dispuso de una serie de 18 tubos conteniendo 10 mL del medio TYI-S-33, adicionado con 1.0 mL de suero y con 0.1 mL de la solución de antibiótico,

posteriormente se inoculó cada tubo con 2×10^4 cél/mL, se incubaron a $37^\circ\text{C}/6$ días, se realizaron cuentas por triplicado cada 24 horas para determinar el incremento de células/mL y el tiempo en el que se alcanzó el máximo rendimiento celular.

6.5.3 Obtención de quistes de *E. histolytica* a partir de heces fecales

Se obtuvieron muestras de heces fecales de pacientes diagnosticados con amibiasis, estas muestras estaban fijadas con formol al 10%, ya en el laboratorio se tomó muestra de las orillas de las heces fecales formadas y pastosas, posteriormente se resuspendió en agua de la llave y se centrifugó a 2,500 rpm/1 min, se eliminó el sobrenadante (este paso se repitió dos veces), enseguida se agregó $\text{ZnSO}_4 \delta=1.18$ g/mL, se centrifugó a 2500 rpm/5 min, se dejó reposar 30 min. y enseguida se recuperó la capa superior en un tubo eppendorf (Fig. 8).

6.5.4 Inducción de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*

6.5.4.1 Diseño experimental

Con el fin de encontrar las condiciones óptimas para inducir *in vitro* la formación de estructuras quísticas de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas, se realizaron una serie de bioensayos los cuales se resumen en la Tabla VI. En estos bioensayos fue empleado el medio TYI-S-33 (Diamond, 1978) y los tratamientos bajo estudio fueron siete factores químicos y cuatro factores fisicoquímicos, los factores químicos analizados fueron la disposición en el medio de cultivo de glucosa, suero, antibiótico, medio condicionado con *Escherichia coli*, medio condicionado con *Enterococcus faecalis*, bilis e histamina, los factores fisicoquímicos fueron reducción del medio de cultivo con CO_2 , el tiempo de gaseo con CO_2 , pH y tiempo de incubación a 37°C , en base a la combinación de estos tratamientos, se diseñaron una serie de bioensayos los cuales se indican a continuación:

1. Ausencia de glucosa, reducción del potencial redox, medio con pH 7
2. Ausencia de glucosa, reducción del potencial redox, medio con pH 9
3. Ausencia de glucosa, sin reducción del potencial redox, medio con pH 7
4. Ausencia de glucosa, sin reducción del potencial redox, medio con pH 9
5. Primera etapa: con de glucosa, con reducción del potencial redox, medio pH 7,
Segunda etapa: ausencia de glucosa, reducción del potencial redox, medio con pH 7
6. Primera etapa: presencia de glucosa, reducción del potencial redox, medio con pH 7
Segunda etapa: ausencia de glucosa, reducción del potencial redox, medio con pH 9
7. Primera etapa: presencia de glucosa, reducción del potencial redox, medio con pH 7
Segunda etapa: con de glucosa, con bilis, reducción del potencial redox, medio pH 7
8. Primera etapa: presencia de glucosa, reducción del potencial redox, medio con pH 7
Segunda etapa: con de glucosa, con bilis, reducción del potencial redox, medio pH 9
9. Primera etapa: presencia de glucosa, reducción del potencial redox, medio con pH 7
Segunda etapa: con de glucosa, reducción del potencial redox, medio pH 7
10. Primera etapa: presencia de glucosa, reducción del potencial redox, medio con pH 7

- Segunda etapa: con de glucosa, reducción del potencial redox, medio pH 9
11. Primera etapa: presencia de glucosa, reducción del potencial redox, medio con pH 7
Segunda etapa: con medio condicionado con enterobacterias, sin glucosa, con histamina, reducción del potencial redox, medio con pH 7
 12. Primera etapa: glucosa, reducción del potencial redox, medio pH 7, segunda etapa: medio condicionado con enterobacterias, con histamina, reducción del potencial redox, medio pH 9
 13. Presencia de glucosa, reducción del potencial redox, pH 7, incubación por 4 días a 37°C
 14. Presencia de glucosa, reducción del potencial redox, pH 7, incubación por 5 días a 37°C
 15. Presencia de glucosa, reducción del potencial redox, pH 7, incubación por 6 días a 37°C
 16. Presencia de glucosa, reducción del potencial redox, pH 7, incubación por 7 días a 37°C
 17. Presencia de glucosa, reducción del potencial redox, pH 9, incubación por 4 días a 37°C
 18. Ausencia de glucosa, reducción del potencial redox, pH 9, incubación por 4 días a 37°C
 19. Presencia de glucosa, reducción del potencial redox, pH 7, incubación por 7 días a 37°C

Para encontrar las condiciones óptimas para inducir *in vitro* la formación de estructuras quísticas de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo multifactorial de 14 x 8 con 4 repeticiones. La unidad experimental fue el trofozoíto de *Entamoeba histolytica* diferenciado a quiste.

El modelo utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j$$

Donde:

Y_{ij} = Valor observado en la K-ésima repetición, del J-ésimo nivel del factor B (factor fisicoquímico) para el i-ésimo nivel del factor A (factor químico)

μ = Representa la medida común de resistencia al detergente antes de aplicar los tratamientos

A_i = Representa el i-ésimo nivel del factor químico (A) (0: ausencia; 1: presencia)

B_j = Representa el j-ésimo nivel del factor fisicoquímico (B) (0: ausencia; 1: presencia) (Steel *et al.*, 2000).

El experimento consistió en evaluar el porcentaje de estructuras semejantes a quistes de *Entamoeba histolytica* inducidos bajo condiciones axénicas que fueron resistentes al detergente triton X-100 al 0.15% por 30 min.

Tabla VI
Bioensayos para inducir el enquistamiento de *Entamoeba histolytica* HMI-IMSS

| Número de bioensayo | Primera etapa | | | | | | | | | | Segunda Etapa | | | | | | | |
|---------------------|---------------|------------|--------------|-----------------|-----------------------|----|-------------------------------|---|-------------|---------|---------------|-------------------|------------|---------------------------|-----------------|-----------------------|----|-------------------------------|
| | Glucosa | Suero 1 mL | Suero 0.1 mL | CO ₂ | Tiempo de gasco (min) | pH | Tiempo incubación 37°C (días) | Medio condicionado con Lactobacillus (3 mL @) | | Glucosa | Suero 1 mL | Ambiente (0.1 mL) | Bilis 1 mL | Histamina 0.6 μV (0.6 mL) | CO ₂ | Tiempo de gasco (min) | pH | Tiempo incubación 37°C (días) |
| | | | | | | | | F. coli | F. faecalis | | | | | | | | | |
| 1 | - | + | + | + | 2 | 7 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | - | + | + | + | 2 | 9 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | - | + | + | - | 1 | 7 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | - | + | + | - | 1 | 9 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | + | + | + | + | 2 | 7 | 3 | - | - | - | + | - | - | + | 2 | 7 | 4 | 4 |
| 6 | + | + | + | + | 2 | 7 | 3 | - | - | - | + | - | - | + | 2 | 9 | 4 | 4 |
| 7 | + | + | + | + | 2 | 7 | 3 | - | - | - | + | - | - | + | 2 | 7 | 4 | 4 |
| 8 | + | + | + | + | 2 | 7 | 3 | - | - | - | + | - | - | + | 2 | 9 | 4 | 4 |
| 9 | + | + | + | + | 2 | 7 | 3 | - | - | - | + | - | - | + | 2 | 7 | 4 | 4 |
| 10 | + | + | + | + | 2 | 7 | 3 | - | - | - | + | - | - | + | 2 | 9 | 4 | 4 |
| *11 | + | + | + | + | 2 | 7 | 3 | + | + | - | + | - | - | + | 2 | 7 | 4 | 4 |
| *12 | + | + | + | + | 2 | 7 | 3 | + | + | - | + | - | - | + | 2 | 9 | 4 | 4 |
| 13 | + | + | + | + | 2 | 7 | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | + | + | + | + | 2 | 7 | 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | + | + | + | + | 2 | 7 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16 | + | + | + | + | 2 | 7 | 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 | + | + | + | + | 2 | 9 | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| o18 | - | + | + | + | 2 | 9 | 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 19 | + | + | + | + | 2 | 9 | 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

* La segunda etapa del método de alta tensión de CO₂ se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer conteniendo 30 mL de medio y se adicionó con 15 mL de medio condicionado de cada una de las enterobacterias, 3 mL de suero, 0.3 mL de antibiótico, 1.8 mL de histamina [0.6mM] y se gasearon con CO₂/ 6 min.

Δ Sólo se emplearon las sales a partir de la composición original (Tabla V)

6.5.4.2 Obtención de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* *in vitro* bajo condiciones axénicas

Se cosecharon células a las 72 h de incubación a 37°C, crecidas en tubos de borosilicato de 16x150mm con tapón de rosca, se despegaron de la base del tubo enfriando estos por 15 min en agua-hielo, se centrifugaron a 1,500 rpm/5 min, se lavaron con PBS pH 7.4, nuevamente se centrifugaron a 1,500 rpm/5 min, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 10 mL de TYI-S-33, se inocularon 2×10^4 cél/mL en 20 tubos de borosilicato con tapón de rosca de 18x150mm conteniendo 15 mL de medio TYI-S-33 adicionado con 1.5 mL de suero y 0.15 mL de antibiótico, (mezcla de penicilina-estreptomicina), posteriormente se gasearon con CO₂/2 min (99.9% grado de pureza) y se incubaron a 37°C por 7 días. Transcurrido este tiempo se cosecharon las estructuras quísticas por decantación, se determinaron las células totales, se centrifugaron a 2000 rpm/10 min, se trataron con el detergente tritón X-100 al 0.15% /30 min y se determinó el porcentaje de estructuras semejantes a quistes, posteriormente se enjuagaron 3 veces con PBS pH 7.4, se eliminó el PBS y finalmente se obtuvo el paquete celular (Fig. 6 y Fig. 8).

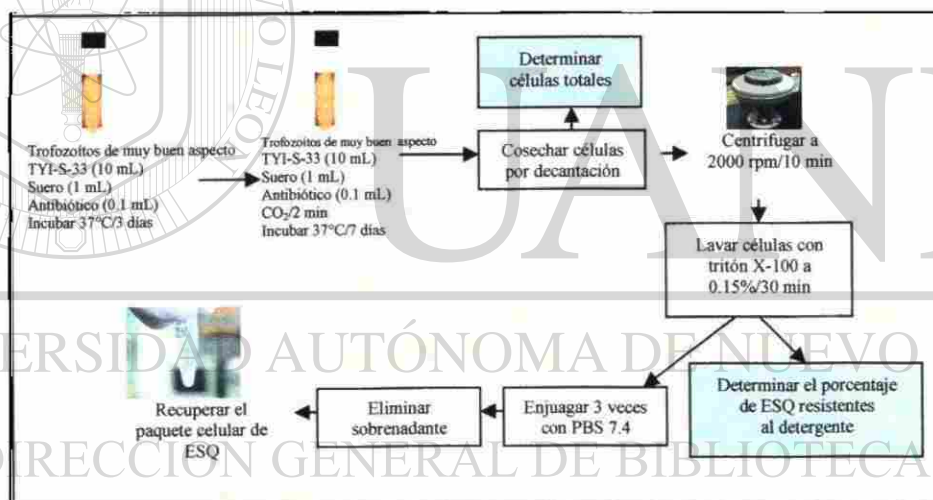


Figura 6. Estrategia experimental para obtener estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. La estrategia consiste básicamente el empleo de trofozoítos en óptimas condiciones, gaseados con CO₂ e incubados a 37°C/ 7 días y una vez transcurrido este tiempo se obtienen abundantes estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* *in vivo*, bajo condiciones axénicas.

6.5.4.3 Cinética de inducción de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* *in vitro* bajo condiciones axénicas

Esta cinética se realizó conforme a los pasos que se describen a continuación.

- 1.-Enfriar el tubo fuente de inóculo (el cual previamente se había inoculado con 2×10^4 cel/mL) a 0-4°C/15 min e incubado a 37°C/3 días.
- 2.-Despegar las células de la base del tubo por agitación suave.

- 3.-Centrifugar a 1,500 rpm/5 min, eliminar el sobrenadante y reservar el paquete celular.
- 4.-Lavar las células con PBS pH 7.4.
- 5.-Centrifugar a 1,500 rpm/5 min.
- 6.-Eliminar el sobrenadante y reservar el paquete celular.
- 7.-Agregar al paquete celular 10 mL de TYI-S-33.
- 8.-Determinar las células/mL.
- 9.-Inocular 2×10^4 cél/mL en 70 tubos de borosilicato con tapón de rosca de 18x150mm conteniendo 15 mL de medio TYI-S-33 adicionado con 1.5 mL de suero y 0.15 mL de antibiótico (mezcla de penicilina-estreptomicina).
- 10.-Gasear cada tubo con CO_2 /2 min (99.9% grado de pureza).
- 11.-Incubar a 37°C por 7 días.
- 12.-Cosechar las estructuras semejantes a quiste por 7 días, cada 24 h, enfriando cada tubo en agua-hielo a 0-4°C/15 min.
- 13.-Determinar las células totales.
- 14.-Verter el volumen total en un tubo cónico y centrifugar a 2000 rpm/10 min.
- 15.-Eliminar el sobrenadante y reservar el paquete celular.
- 16.-Retar células al detergente tritón X-100 al 0.15% /30 min.
- 17.-Determinar el porcentaje de estructuras semejantes a quistes resistentes al detergente tritón X-100.
- 18.-Graficar resultados y analizar.

6.5.5 Inducción del ciclo de vida axénico *in vitro* de *E. histolytica*

A partir de las estructuras semejantes a quistes y resistentes al tritón X-100 [0.0001%]/30 min, y separadas por el método de densidad discontinua por gradientes de Percoll, se realizó la prueba de viabilidad (desenquistamiento) *in vitro* como se describe a continuación:

- 1.-Se obtuvieron las formas semejantes a quistes de *E. histolytica*, resistentes al tritón X-100 [0.0001%] /30 min.
- 2.-Se enjuagaron tres veces empleando PBS.
- 3.-Se centrifugó a 1200 rpm/5 min y el paquete se lavó 2 veces con TYI-S-33.
- 4.-Nuevamente se obtuvo el paquete celular.
- 5.-Se inoculó el paquete celular obtenido en un tubo de 13x100 mm de borosilicato con tapón de rosca contiendo 5 mL de medio TYI-S-33, adicionado con suero bovino al 1% y se incubó a 37°C.
- 6.-Se hicieron observaciones cada 24 h hasta detectar y evidenciar el inicio del proceso de desenquistamiento.

Una vez que inició el proceso de desenquistamiento, por decantación se eliminó aquellas estructuras quísticas que no desenquistaron, dejando solamente aquellas células que ya se encontraban adheridas a la base del tubo de vidrio, se les agregó nuevamente 10 mL del medio TYI-S-33, adicionado con 1.0 mL de suero y 0.1 mL de la mezcla de antibiótico y se incubó a 37°C hasta que se observó un cultivo confluyente.

De este nuevo cultivo, posteriormente se realizó una resiembra en tubos de borosilicato con tapón de rosca conteniendo 10 mL de medio TYI-S-33 completo, a los que se les inoculó 20,000 cél/mL, se incubaron a 37°C/72h, posteriormente se realizaron cinéticas por triplicado y se realizaron lecturas cada 24 h, para comparar la cinética de crecimiento normal contra la cinética a partir de las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* desenquistadas *in vitro*.

Una vez que se obtuvieron las estructuras semejantes a quistes *in vitro*, así como quistes de *Entamoeba histolytica* a partir de muestras de pacientes se procesaron como se describe a continuación:

6.5.6. Separación por gradiente discontinuo de Percoll

Las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* fueron separadas por el método de densidad discontinua por gradientes de Percoll. El gradiente discontinuo se realizó en tubos de vidrio de 10x75mm conteniendo 0.5 mL de percoll al 100%, 80%, 60%, 50%, 30%, 20% y 10%, posteriormente se depositó lentamente y con cuidado el paquete celular (estructuras semejantes a quistes); se centrifugó a 1,200 rpm/30 min a temperatura ambiente, en una centrifuga Solvat J-600, rotor oscilante J600R2005. Se recuperó en un tubo eppendorf la muestra que se obtuvo en percoll en la interfase 20-30%, posteriormente se lavaron tres veces en PBS y posteriormente se centrifugaron a 1,200 rpm/ 2 min. y se obtuvo el paquete celular, enseguida se lavaron dos veces en H₂O desionizada para eliminar el resto de percoll como se muestra en la figura 7.



Figura 7. Separación de células por gradiente discontinuo de percoll. Para separar las estructuras semejantes a quistes y quistes de *E. histolytica* empleamos la técnica de gradiente discontinuo de percoll.

6.5.7 Tinciones

Posteriormente a las estructuras semejantes a quistes, resistentes al tritón X-100 [0.15%]/ 30 min, y separadas por el método de densidad discontinua por gradientes de Percoll, se procedió a realizar las siguientes tinciones de:

6.5.7.1 Pared celular (tinción especial)

La muestra se fijó con glutaraldehído y posteriormente se observó a microscopia de fluorescencia, para lo cual una gota de esta muestra fue colocada sobre un portaobjetos y sobre esta se agregó una gota de calcoflúor M2R al 1% y se observó inmediatamente con luz U.V. empleando un Microscopio confocal láser con un microscopio OlympusIX70 usando el canal de detección BA51OIF con 494nm. **Nota:** Como testigo empleamos quistes de *Entamoeba invadens*, los cuales produjimos *in vitro* empleando el Método de Alta Tensión de CO₂ (Morales, 1991).

6.5.7.2 Núcleos (tinción especial)

En un portaobjetos se mezcló una pequeña cantidad de muestra con una gota de yodo-lugol, se colocó el cubreobjetos, se analizó el microscopio de luz Zeiss-axiostar y se fotodocumentó con una cámara digital SONY DSCp32- cyber-shot de 3 megapixeles.

6.5.7.3 Citoplasma y núcleo (tinción diferencial)

Empleando la tinción tricrómica de Gomori se procedió a teñir las estructuras semejantes a quistes de acuerdo a las técnicas descritas a continuación.

- 1.-Depositar el material a teñir en un tubo cónico, agregar el fijador de Shaudinn (solución 1) y dejar actuar por 1h a temperatura ambiente.
- 2.-Centrifugar la muestra 10 seg. en una microcentrifuga Eppendorf y eliminar el fijador por decantación.
- 3.-Agregar alcohol al 70%-yodado (solución 2) por 1 min.
- 4.-Repetir el paso 2 para eliminar la solución 2
- 5.-Agregar alcohol al 70% por 1 min.
- 6.-Repetir el paso 2 para eliminar el alcohol al 70%
- 7.-Agregar alcohol al 70% por 1 min.
- 8.-Repetir el paso 2
- 9.-Agregar el colorante tricrómico de 2-8 min. (según sea necesario)
- 10.-Repetir el paso 2
- 11.-Agregar alcohol acidificado al 90% de 15seg.
- 12.-Repetir paso 2
- 13.-Agregar alcohol al 95% (solamente enjuagar)

- 14.-Repetir paso 2
- 15.-Agregar alcohol al 95% (enjuagar)
- 16.-Agregar alcohol al 100%
- 17.-Repetir paso 2
- 18.-Agregar xilol por 1 min.
- 19.-Repetir el paso 2
- 20.-Se toma una pequeña gota y se deposita en un cubreobjetos limpio.
- 21.-Montar la muestra empleando resina entellan.

Para las muestras obtenidas a partir de heces fecales de pacientes se procedió de la siguiente manera:

- 1.-Agregar alcohol al 70%-yodado (solución 2) por 10 min.
- 2.-Centrifugar la muestra 10 seg. en una microcentrifuga eppendorf y eliminar el fijador por decantación
- 3.-Agregar alcohol al 70% por 4 min
- 4.-Repetir el paso 2 para eliminar la solución 2
- 5.-Agregar alcohol al 70% por 4 min
- 6.-Repetir paso 2 para eliminar el alcohol al 70%
- 7.-Agregar el colorante tricrómico de 10 min. (según sea necesario)
- 8.-Repetir el paso 2
- 9.-Agregar alcohol acidificado al 90% de 15seg.
- 10.-Repetir el paso 2
- 11.-Agregar alcohol al 95% (solamente enjuagar)
- 12.-Repetir paso 2
- 13.-Agregar alcohol al 95% por 5 min
- 14.-Repetir paso 2
- 15.-Agregar carbol-xilol por 8 min.
- 16.-Repetir paso 2
- 17.-Agregar xilol por 10 min.
- 18.-Repetir el paso 2
- 19.-Se toma una pequeña gota y se deposita en un cubreobjetos limpio.
- 20.-Montar la muestra empleando resina entellan.

Nota: En esta tinción el citoplasma de quistes y trofozoítos se observan de tonalidad azul-verdosa, con tintes púrpuras, el material nuclear se aprecia de tonalidad rojiza y el fondo de la preparación de una tonalidad verde claro.

6.5.8 Microscopía

Se procedió a preparar muestras para microscopía electrónica y de fuerza atómica de acuerdo a las técnicas siguientes:

6.5.8.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

- 1.-A partir de las formas semejantes a quistes y resistentes al tritón X-100 [0.15%]/ 30 min, y separadas por el método de densidad discontinua por gradientes de Percoll, se fijó con glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfatos 0.2M/24h a 4°C, (ver Nota).
- 2.-Centrifugar
- 3.-Lavar tres veces con PBS
- 4.-Agregar PBS 12M + OsO₄ e incubar durante 1 h a 4°C.
- 5.-Centrifugar y eliminar el sobrenadante
- 6.-Deshidratar en etanol al 60%/10 min (el etanol puede ser sustituido por cetona)
- 7.-Deshidratar en etanol al 70%/10 min
- 8.-Deshidratar en etanol al 80%/10 min
- 9.-Deshidratar en etanol al 90%/10 min
- 10.-Deshidratar en etanol al 100%/10 min (repetir dos veces)
- 11.-Lavar dos veces con óxido de propileno por 15 min. (el óxido de propileno puede sustituirse con cetona)
- 12.-Agregar óxido de propileno y resina en proporción 3:1 por 3h
- 13.-Colocar muestra en resina y óxido de propileno en proporción 1:1 por 12 h
- 14.-Incluir en resina al 100%, polimerizar a 65°C por 48h.
- 15.-Realizar cortes semifinos
- 16.-Teñir con azul de toluidina
- 17.-Observar a microscopio óptico.
- 18.-Realizar cortes finos
- 19.-Teñir con acetato de uranilo y citrato de plomo
- 20.-Observar en microscopio electrónico Zeiss EM-109.

6.5.8.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

- 1.-A partir de las formas semejantes a quistes y resistentes al tritón X-100 [0.15%]/ 30 min, y separadas por el método de densidad discontinua por gradientes de Percoll, se fijó con glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfatos 0.2M/24h a 4°C, (ver Nota).
- 2.-Centrifugar
- 3.-Lavar tres veces con PBS
- 4.-Centrifugar y eliminar el sobrenadante
- 5.-Deshidratar en etanol al 50%/10 min
- 6.-Deshidratar en etanol al 60%/10 min
- 7.-Deshidratar en etanol al 70%/10min
- 8.-Deshidratar en etanol al 80%/10 min
- 9.-Deshidratar en etanol al 90%/10 min
- 10.-Deshidratar en etanol al 100%/10 min (repetir dos veces)
- 11.-Colocar muestras sobre cubreobjetos de 5mm de lado por lado.
- 12.-Adherir cubreobjetos sobre portamuestras de bronce, utilizando cinta de teflón de doble cara.

- 13.-Introducir el portamuestras con la muestra adherida a un desecador de punto crítico (Electron Microscopy Science EMS850) durante 15 min a 10°C.
- 14.-Cubrir muestras con oro en un recubridor de capa fina JOEL DSM950 a una velocidad de depósito de 350Å a 15-20 Kv durante 30 seg
- 15.-Observar en un microscopio electrónico de barrido JEOL/EO JSM-6360 versión 1.1, operado a una aceleración de voltaje de 20 kV.
- 16.-Fotodocumentar y realizar el análisis.

6.5.8.3 Microscopía de Fuerza Atómica (MFA) de No-Contacto y Contacto Intermitente o Tapping.

- 1.-De las formas semejantes a quistes y resistentes al tritón X-100 [0.15%]/30 min, y separadas por el método de densidad discontinua por gradientes de Percoll, se fijó con glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfatos 0.2M/24h a 4°C.
- 2.-Centrifugar
- 3.-Lavar tres veces con PBS
- 4.-Centrifugar y eliminar el sobrenadante
- 5.-Deshidratar en etanol al 50, 60, 70, 80 y 90 %/10 min. en cada concentración.
- 6.-Deshidratar en etanol al 100%/10min (repetir dos veces).
- 7.-Colocar muestras sobre cubreobjetos de 5mm de lado por lado.
- 8.-Introducir el portamuestras con la muestra adherida a un desecador de punto crítico (Electron Microscopy Science EMS850) por 15min/10°C.
- 9.-Despegar la muestra y colocar sobre el portamuestras especial para microscopía de fuerza atómica.
- 10.-Observar muestras empleando un microscopio de fuerza atómica de No-contacto y Contacto intermitente o tapping.
- 11.-Fotodocumentar y analizar.

Nota: En caso de procesar trofozoítos para las diferentes microscopías, estos se enfriaron a 4°C/15 min, se cosecharon, y se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en PBS durante 24h a 4°C.

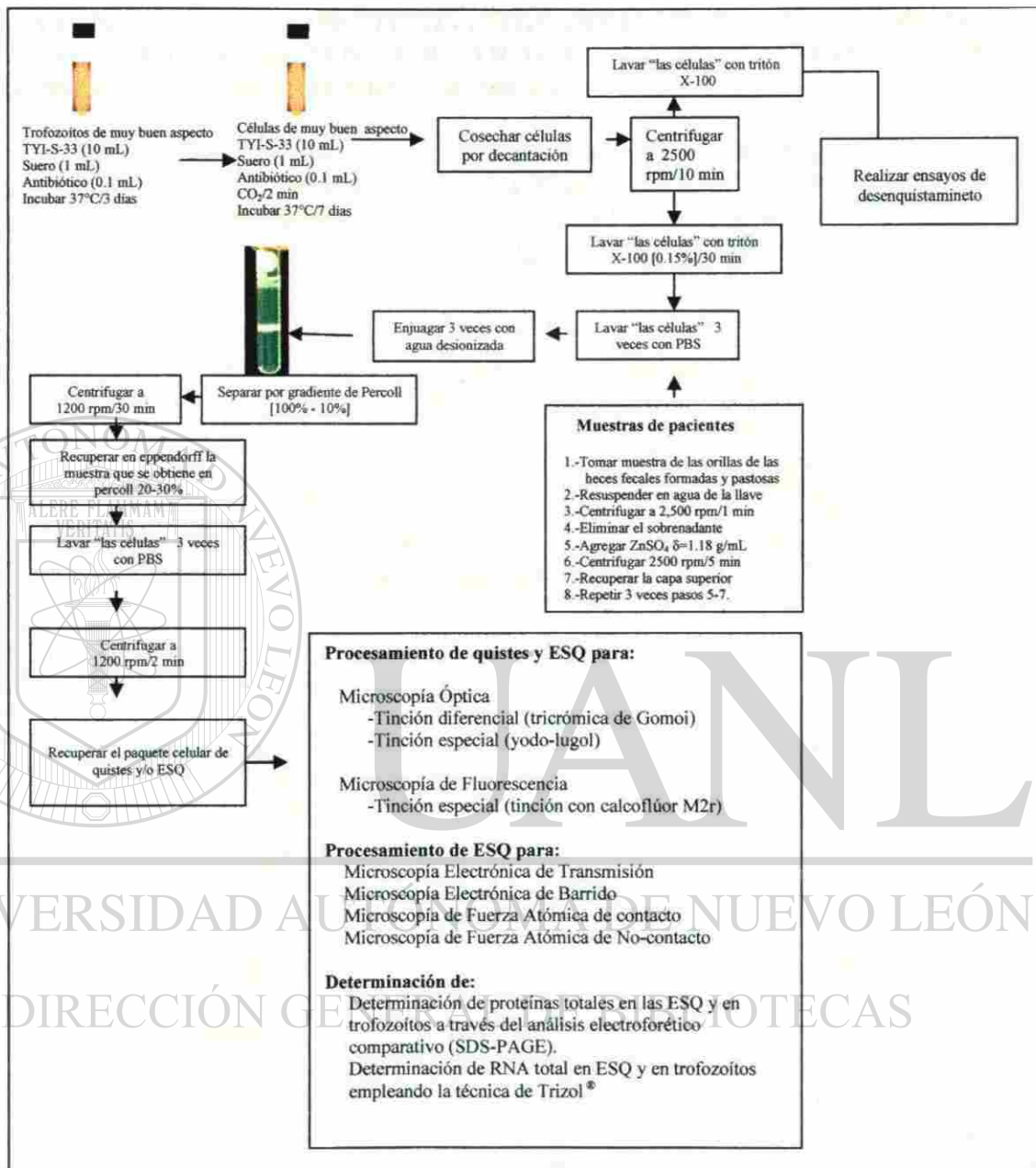


Figura 8. Estrategia experimental general. Esta estrategia fue empleada para procesar estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* obtenidas bajo condiciones axénicas *in vitro*.

6.6 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICOS COMPARATIVOS (SDS-PAGE) DE LOS COMPONENTES PROTEÍCOS DE TROFOZOITOS Y DE ESTRUCTURAS SEMEJANTES A QUISTES DE *E. histolytica*

Los componentes protéicos de los extractos fueron visualizados mediante electroforesis SDS-PAGE utilizando la técnica descrita por Laemmli, 1970. Para esto se elaboraron geles de poliacrilamida siendo el gel separador al 10%, y el gel concentrador al 5% los cuales se realizaron con las siguientes mezclas:

Tabla VII

Composición del gel separador de poliacrilamida al 10%

| Mezclar: | Volumen |
|---|----------|
| Agua destilada | 2.442 mL |
| Buffer Tris-SDS ph (8.8)4X | 1.250 mL |
| Acrilamida al 40% | 1.248 mL |
| APS(Ammonium persulfate) al 10% | 50 µL |
| TEMED ,N,N', N' -Tetramethylethylenediamine | 10 µL |

Tabla VIII

Composición del gel concentrador al 5%

| Mezclar: | Volumen |
|---|----------|
| Agua destilada | 1.880 mL |
| Buffer Tris-SDS ph (6.8)4X | 0.750 mL |
| Acrilamida al 40% | 0.370 mL |
| APS(Ammonium persulfate) al 10% | 50 µL |
| TEMED ,N,N', N' -Tetramethylethylenediamine | 10 µL |

Una vez realizadas ambas mezclas se procedió conforme a los siguientes pasos:

1. Montar vidrios
2. Llenar los vidrios anteriormente montados agregando primero la mezcla correspondiente del gel separador esperando 10 minutos a que polimerice para después agregar la parte correspondiente al gel concentrador aproximadamente 1.5 cm y colocar los peines.
3. Una vez polimerizado el gel se sacan los peines con cuidado y lavar los carriles con agua destilada.
4. Colocar el gel dentro de la minicámara vertical de electroforesis (E-C 120 Apparatus, Holbrook, NY) cubriendo el gel con el buffer de corrida Tris-glicina 1X.
5. Preparar la muestra agregando proporcionalmente la misma cantidad del buffer de carga 2x (Tris-HCl 100mM pH 6.8, SDS 1%, 2-β-mercaptoetanol 4%, Coomassie Brilliant blue G 0.02% y Glicerol 24%) a la cantidad de la muestra.
6. Homogeneizar las muestras empleando un sonicador (30 seg. para trofozoitos y 60 seg para quistes).

7. Mezclar las muestras por pipeteo para lograr homogenizarlas
8. Someter a ebullición por 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y facilitar su migración.
9. Depositar las muestras en el gel corriendo inicialmente a 80V por 10 minutos, para que las muestras entren al gel y después incrementando a 100V hasta que el frente de corrida llegue al término del vidrio. NOTA: Cubrir el gel con buffer de corrida Tris-glicina 1X.
10. Una vez concluida la electroforesis, el gel se saca con cuidado y se coloca en la solución de tñido de azul de Coomassie durante toda la noche y posteriormente se depositará en la solución decolorante, dejándose por un par de horas hasta observar las bandas de interés.
11. Una vez decolorado el gel se colocará dentro del papel celofán dulce entre dos marcos de acrílico para secarlo.
12. Escanear y fotodocumentar.

6.7 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL AMIBIANO POR EL MÉTODO TRIZOL®

Se extrajo el RNA total de los trofozoítos y de las estructuras semejantes a quistes de *Entamoeba histolytica* para su cuantificación con Trizol® siguiendo la metodología que a continuación se describe:

1. Se homogeneizó la muestra de 5×10^6 cél/mL de trizol dejando incubar a temperatura ambiente por 5 min.
2. Se agregaron 0.2 mL de cloroformo por cada mL de Trizol® utilizando vortex para agitar por 15 segundos y posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 15 min.
3. Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C.
4. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y en éste se agregará 0.5 mL de isopropanol por cada mL de Trizol® e incubar 5 min a temperatura ambiente.
5. Se centrifugó a 14,000 rpm por 8 min a 4°C.
6. Se removió el sobrenadante para lavar con 1 mL de etanol al 75% por cada mL de Trizol® y se dejó secar al aire por 3-5 min.
7. Se centrífugo a 8,000 rpm por 15 min.
8. Se removió el sobrenadante y se dejó secar al aire por 3-5 min.
9. Se resuspendió la pastilla en 30 µL de H₂O DEPC a 65°C por 5 min.
10. Se cuantificó el RNA disolviendo 1 µL de muestra en 999µL de H₂O DEPC, y se realizó la lectura en un espectrofotómetro con lámpara de luz UV (Beckman DU® 652 Spectrophotometer) a una longitud de onda de 260 nm.
11. Para visualizar la muestra se realizó un gel de agarosa al 0.8%, como se describe a continuación:
 - a) Se tomaron 3.69 µl de la muestra de estructuras semejantes a quistes y 0.454µl de la muestra de trofozoítos y fueron colocadas en un tubo eppendorf y se le añadió 1 µl de jugo azul 6X (azul de bromofenol y xilencianol) y se mezcló perfectamente.
 - b) El contenido de cada uno de los tubos se colocó en los pozos del gel de

agarosa al 0.8%, colocando además un marcador de peso molecular pbs(plasmid blue script) y se realizó la electroforesis a 100V hasta que la banda azul de bromofenol llegó $\frac{3}{4}$ partes antes del borde inferior (aproximadamente 35 min).

- c) Una vez terminada la electroforesis, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio de $2\mu\text{g}/\text{mL}$ por 5 min.
- d) Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV.

6.8 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIA CI_{50} DEL METRONIDAZOL, CAFEÍNA, TEOFILINA, NaF, Y EXTRACTO METANÓLICO DE *Castela texana* SOBRE TROFOZOITOS DE *E. histolytica*.

Se enfrió el tubo fuente de inóculo a $0-4^{\circ}\text{C}/10$ min, se determinó el número de células/mL, se dispuso de una serie de 18 tubos de $16 \times 125\text{mm}$ conteniendo 10 mL del medio TYI-S-33, adicionados con 1 mL de suero, así como los agentes químicos a evaluar (metronidazol 1.0, 0.5 y $0.1\ \mu\text{g}/\text{mL}$, cafeína 9.0, 4.5 y $1.5\ \text{mg}/\text{mL}$, extracto metanólico de *Castela texana* 0.50, 0.35 y $0.15\ \text{mg}/\text{mL}$, NaF 4.5, 3.0 y $1.5\ \text{mg}/\text{mL}$ y teofilina 7.5, 3.0 y $1.5\ \text{mg}/\text{mL}$, se inoculó a cada tubo con 2×10^4 cel/mL, se incubó a 37°C y se realizaron cuentas por triplicado a las 72 h. Posteriormente empleando las Tablas B-Probit (Ver Anexo-A) y el programa Excel para Windows XP2000 se determinó el valor correspondiente a la CI_{50} para cada agente químico.

6.8.1 Efecto de agentes químicos sobre el enquistamiento de *E. histolytica*

Para evaluar la acción de cada agente químico sobre el enquistamiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*, se dispuso de una serie de 10 tubos de 18×150 mm conteniendo 15 mL de medio TYI-S-33 adicionado con 1.5 mL de suero, se inoculó cada tubo con 2×10^4 cél/mL, se gasearon con CO_2 y se incubaron a 37°C por 3 días, transcurrido este tiempo, bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar VECO, se destapó cada tubo y se les agregó la concentración correspondiente a la CI_{50} de cada agente químico a evaluar y como control negativo se empleó el calcoflúor M2r a una concentración de $9.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$, posteriormente se gaseó cada tubo con CO_2 por 2 min y se incubaron a 37°C por 4 días. Transcurrido este tiempo se cosecharon las estructuras quísticas por decantación, se centrifugaron a $1500\ \text{rpm}/5$ min, las formas semejantes a quistes fueron sometidas a prueba de resistencia empleando Tritón X-100 [0.15%]/30 min., posteriormente se procedió a determinar las células/mL para comparar el efecto de cada agente químico en el proceso de diferenciación de *E. histolytica*. Para este ensayo se dispuso de un control (método de enquistamiento en ausencia de agentes químicos) y un testigo (método de enquistamiento en presencia de metronidazol $0.144\ \mu\text{g}/\text{mL}$) cada experimento se realizó en tres eventos independientes por triplicado, como se describe en la figura 9.

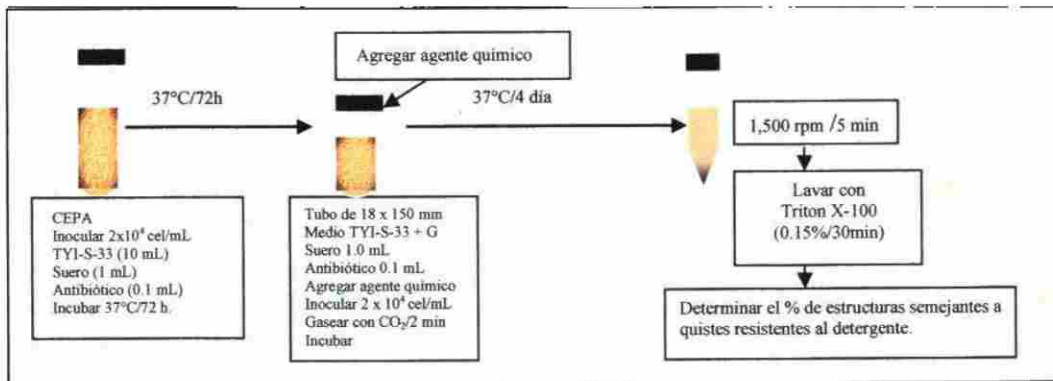


Figura 9. Estrategia experimental para determinar el efecto de agentes químicos sobre el proceso de diferenciación de *E. histolytica* *in vitro*. Una vez determinada la CI_{50} de cada agente químico se llevó a cabo la evaluación de su efecto sobre el proceso de diferenciación, siendo agregado cada agente químico al final de la fase estacionaria del crecimiento de *E. histolytica*.

6.8.2 Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de los resultados obtenidos al comparar el efecto de los agentes químicos (calcoflúor M2r, metronidazol, NaF, Cafeína, Teofilina y extracto metanólico de *Castela texana*) sobre la inducción bajo condiciones axénicas *in vitro* de estructuras quísticas de *Entamoeba histolytica*, los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente, utilizando el análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba de comparación múltiple de Tuckey con un nivel de significancia menor al 5% para los análisis realizados. Los datos obtenidos se ingresaron en el programa computacional Sigma Plot-2006.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABSTRACT

Amebiasis is a parasitic infection caused by the protozoan *Entamoeba histolytica*. It is the third leading parasitic cause of death worldwide, surpassed only by malaria and schistosomiasis. Amebiasis affects approximately 50 million persons each year, resulting in near 100,000 deaths. Its life cycle consists of two stages: the trophozoite, the invasive and the most studied stage and the cyst. This is the infective and less studied stage due to the absence of an axenic medium that promotes mass encystation *in vitro*. In this study the objective was the induction of the life cycle of *Entamoeba histolytica* *in vitro* under axenic condition and the inhibition of its life cycle employing NaF, teophiline, caffeine, metronidazol and *Castela texana* methanolic extracts. In this study, we present a methodology to induce the formation of cyst-like structures of *E. histolytica* under axenic conditions. Cyst-like structures of *E. histolytica* used in this work were produced using the called TGC7-method (TYI-S-33 media with glucose and high CO₂ tension for 7 days), in this method the trophozoites in optimal conditions were inoculated in TYI-S-33 with glucose medium, were CO₂ gassed for 2 min and incubated at 37°C for 7 days. The cyst-like structure of *E. histolytica* thus obtained show the follow characteristics: they forming aggregates, are spherical structures, have resistance to [0.15 %] triton X-100 for 10 min, present high signal of fluorescence under UV light when stained with 10% calcofluor M2r, transmission electron micrograph also showed multinucleated cyst-like structure with condensed chromatin attached to nuclear membrane, contain big vacuoles in cytoplasm and a thin cell wall. Scanning electron micrograph and atomic force microscopy showed a wrinkled wall. To induce excystation of *E. histolytica* under axenic conditions *in vitro*, cyst-like structures resistant to 0.0001% triton X-100 for 30 min, were inoculated in TYI-S-33 and a new population of *E. histolytica* trophozoites was obtained, the excystation is an asynchrony process. CI₅₀ of NaF, teophiline, caffeine, metronidazol and of *Castela texana* methanolic extract were determinated for *Entamoeba histolytica* trophozoites for each chemical agent and evaluated in the induction of cyst-like structures, the most effective inhibitors for induction of cyst-like structures were respectively metronidazole, calcofluor M2r and *Castela texana* methanolic extracts. No significant difference was obtained with the other treatments in comparison with the control.

2. INTRODUCCIÓN

Se estima que el 10% de la población mundial está infectada por *Entamoeba histolytica*, lo que representa aproximadamente 50 millones de casos de amibiasis invasora y hasta 100,000 muertes por año, colocando a la amibiasis en el tercer lugar después de la malaria y la esquistosomiasis en mortalidad por parásitos protozoarios. En países con economía emergente, el 50% de la población está infectada por *E. histolytica* (OMS, 1997).

Entamoeba histolytica existe en dos formas evolutivas: el trofozoíto y el quiste (Fig.1), los trofozoítos presentan un tamaño de 20-40 μm de diámetro, son muy dinámicos, de locomoción rápida, presenta pseudópodos y durante su movimiento se diferencia muy bien el ecto y endoplasma. En el citoplasma presenta un núcleo y gran cantidad de vacuolas ricas en glucógeno, además presenta ribosomas arreglados en hélices los cuales tienden a agregarse para formar barras elongadas con bordes redondeados (conocidos como cuerpos cromatóides). El núcleo es esférico, mide de 4 a 7 μm de diámetro el cual consiste de una membrana nuclear acromática la cual es doble y está interrumpida por numerosos poros nucleares de 65 nm de diámetro, al interior de la membrana nuclear se localizan gruesos cúmulos de cromatina condensada, presenta un pequeño cariosoma esférico central de 0.5 μm de diámetro (Diamond y Clark, 1993). La división nuclear ocurre por mitosis cerrada, ya que la membrana nuclear no se fragmenta y no está sincronizada con la citocinesis.



Figura 1. Estadios del ciclo de vida de *E. histolytica*. La imagen A corresponde a un trofozoíto y la imagen B corresponde a un quiste, en esta imagen es evidente la diferencia morfológica que guarda *E. histolytica* en cada estadio o fase de su ciclo de vida.

Los trofozoítos tienen forma elongada con uno o varios pseudópodos frontales, un uroide, muestran movimientos citoplásmicos y de desplazamiento continuos, el diámetro de la célula varía entre 10 y 60 μm (el tamaño varía dependiendo de donde se obtenga el

trofozoíto, ya sea de lesiones intestinales, hepáticas o de cultivos), las amibas obtenidas de lesiones intestinales o hepáticas miden entre 20 y 40 μm , las encontradas en heces o en cultivos en promedio miden de 10 a 30 μm . La intensa actividad endocítica de los trofozoítos se manifiesta por numerosos estomas de pinocitosis o de fagocitosis (Martínez y Espinosa, 2003), son muy dinámicos y la forma y motilidad dependen en gran medida de la temperatura, pH, osmolaridad y potencial de oxido-reducción.

Los quistes de *E. histolytica* son esféricos u ovoides y algunas veces aparecen irregulares (Dobell, 1928; y Proctor and Gregory, 1973), en promedio miden de 10 a 20 μm , poseen una pared de aproximadamente 0.5 μm (Avron *et al.*, 1986) ó 0.125 a 0.150 μm de grosor (Chávez *et al.*, 1978). Contiene normalmente cuatro núcleos cuando están maduros y raramente presentan ocho núcleos, los quistes inmaduros frecuentemente poseen numerosos depósitos con glucógeno, cuerpos cromatoides compuestos por ribosomas que se agregan para formar estructuras alargadas en forma de bastón con extremos redondeados, los cuales disminuyen cuando el quiste madura. El núcleo es morfológicamente similar al de los trofozoítos (Diamond y Clarck, 1993). La biología del quiste resulta más difícil de estudiar debido a que hasta ahora no ha sido posible lograr el enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas.

Para lograr en un futuro el control adecuado de la amibiasis es importante el conocimiento de los cambios bioquímicos y morfológicos que ocurren durante el enquistamiento así como en el proceso de desenquistamiento; sin embargo hasta el día de hoy distan mucho de ser comprendidos estos procesos debido a que han sido pobremente estudiados dada la falta de un medio o modelo biológico que permita reproducir el ciclo de vida de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3. HIPÓTESIS

Es posible desarrollar en condiciones axénicas el ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* *in vitro* e inhibir su diferenciación, como un modelo para el estudio del control de la amibiasis a nivel del hospedero y del ambiente

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Desarrollar el ciclo de vida axénico de *Entamoeba histolytica* *in vitro* e inhibir el proceso de enquistamiento empleando agentes químicos.

4.2. Objetivos particulares

- 1.-Obtener la cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica* cepa HMI-IMSS bajo condiciones axénicas.
- 2.-Realizar ensayos de enquistamiento de *Entamoeba histolytica* cepa HMI-IMSS, bajo condiciones axénicas.
- 3.-Describir los cambios en la ultraestructura durante la diferenciación *in vitro* de *Entamoeba histolytica*.
- 4.-Describir los cambios en la pared celular durante la diferenciación *in vitro* de *Entamoeba histolytica*.
- 5.-Realizar ensayos de desenquistamiento de *Entamoeba histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*.
- 6.-Inducir y describir el ciclo de vida axénico de *Entamoeba histolytica* HMI-IMSS *in vitro*.
- 7.-Realizar el análisis electroforético comparativo SDS-PAGE de los componentes protéicos de trofozoitos y estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*.
- 9.-Cuantificar el RNA total en trofozoitos y estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* mediante la técnica de Trizol®.
- 10.-Determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) sobre trofozoitos de *E. histolytica* de la cafeína, teofilina, NaF, extracto metabólico de *Castela texana* y metronidazol.
- 11.-Evaluar el efecto de la CI₅₀ de la cafeína, extracto metanólico de *Castela texana*, NaF y teofilina sobre el enquistamiento axénico de *Entamoeba histolytica* *in vitro*.

5. ANTECEDENTES

5.1. AMIBIASIS

La humanidad ha padecido la amibiasis desde hace milenios, sin embargo no fue posible el reconocimiento de ningún protozooario sino hasta después de la invención del microscopio por parte de Antonie van Leeuwenhoek a finales del siglo XVII (Dobell, 1932). Se han encontrado en la India documentos sánscritos (Brigu-samhita) de más de 3,000 años de antigüedad que refieren casos de diarrea mucosanguinolenta (Vaidya and Ray, 1982), así como en Siria, Babilonia y a la orilla del Tigris y Eufrates seis siglos antes de Cristo (Bray, 1996). La amibiasis pudo haber sido reconocida como una enfermedad mortal por Hipócrates (460-377 a.C.), quien describió a un paciente con disentería y fiebre perianal (Kean, 1988). También existen reportes que dan evidencia de la dispersión de la amibiasis por Europa, el resto de Asia, Persia y Grecia, por otra parte la amibiasis pudo haber sido introducida al Nuevo Mundo por parte de los Europeos en el siglo XVI (Crosby, 1986). La primera descripción de las amibas, correspondió a los microorganismos que cambiaban de forma reportado por Rosel Van Rosenhof en 1755, a los que llamó "El pequeño proteo", en 1839 se crea el género *Amoeba*; Lambl, 1859; publicó la identificación microscópica de un microorganismo que encontró al estudiar las heces de un niño en Praga, quien padecía de la denominada diarrea infantil; sin embargo consideró que este protozooario no era patógeno y aparecía asociado a casos de patología intestinal. Lewis y Cunningham en 1870 y 1871 respectivamente, aislaron al microorganismo a partir de materia fecal de un paciente con diarrea con enfermedad colérica, pero consideraron que se trataba de un microorganismo inocuo (Martínez, 1987).

Se ha establecido como 1875 fecha en que se realiza el descubrimiento de *E. histolytica* por parte de Fredor Aleksandrovich Lösch, él publicó su trabajo denominado "Desarrollo masivo de amibiasis en el intestino grueso", (en una revista médica de Berlín, editado por el Dr. Rudolf Virchow) y ésta enfermedad fue adjudicada a *Entamoeba gingivalis*, la cual después fue designada con el nombre de *Entamoeba histolytica* (Imperato, 1981). En un tratado sobre absceso amibiano realizado por Kapoor, 2006, menciona que Koch R. en 1887, describió la relación entre la disentería amibiana y el absceso hepático al encontrar amibas en este último así como en heces y colon de pacientes con disentería, además de identificarlas en conductos capilares hepáticos de pacientes que también padecían de abscesos hepáticos; en el mismo año Hlava en Checoslovaquia demostró el poder patógeno de la amiba en forma experimental a partir de microorganismos obtenidos de pacientes con disentería y Kartulis, 1886; demostró la etiología amibiana en 20 casos de absceso hepático, Osler, 1890 informó el primer caso de absceso hepático diagnosticado en los Estados Unidos

de Norteamérica; Councilman y Lafleur, 1891, crearon el término de “disentería amibiana”, Quincke y Ross, 1893, descubrieron las formas quísticas y Schaudinn, 1903; la bautizó definitivamente como *Entamoeba histolytica*, confirmándose por los alemanes Walter y Sellards, 1913, que éste protozooario era el causante de la colitis amibiana.

5.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Entamoeba histolytica es un protozooario cuya clasificación taxonómica de acuerdo con Carliss *et al.*, 1969 y Levine *et al.*, 1980, es la siguiente:

Tabla I

Clasificación taxonómica de *E. histolytica*

| | |
|-------------|--------------------|
| Reino: | Protista |
| Subreino: | Protozoo |
| Phylum: | Sarcomastigophora |
| Subphylum: | Sarcodina |
| Superclase: | Rhizopoda |
| Clase: | Lobosea |
| Subclase: | Gymnamoebidae |
| Orden: | Amoebidae |
| Suborden: | Acantophodina |
| Familia: | Endamoebidae |
| Género: | <i>Entamoeba</i> |
| Especie: | <i>histolytica</i> |

5.3. EPIDEMIOLOGÍA

La amibiasis es responsable de aproximadamente 100,000 muertes por año, principalmente en México, Centro y América del Sur, (principalmente la zona oeste), oeste y el sur de África (particularmente entre la población de raza negra), zonas del Oriente Medio, Sur y Sudeste de Asia (Jackson, 2000), la amibiasis es la tercer causa de muerte por infecciones parasitarias después de la malaria y la esquistosomiasis (OMS, 1997). En países en vías de desarrollo, en los que existen importantes deficiencias de saneamiento la amibiasis se presenta como una enfermedad infecciosa endémica en un amplio rango de temperaturas, sin embargo es típica de regiones tropicales. La prevalencia de la amibiasis varía de individuo a individuo, entre países y entre áreas con diferente condición socioeconómica, en algunas regiones con pobres condiciones sanitarias, el 50% del total de la población se encuentra afectada.

Estudios epidemiológicos han demostrado que el estatus socioeconómico bajo y condiciones sanitarias inadecuadas son factores de riesgo significativamente independientes para la infección. En México constituye un problema importante por su

frecuencia y mortalidad (Gutiérrez y Muñoz, 1994) el 11% de la población en edad de 5 a 9 años presentan la infección por *E. histolytica* y el 9.34% de las mujeres se encuentran infectadas (Caballero *et al.*, 1994). Estudios seroepidemiológicos han reportado que en regiones de bajo riesgo epidemiológico es raro detectar anticuerpos anti*amiba* y en regiones con alto riesgo epidemiológico se ha encontrado de 50 a 80% de la población total presentan anticuerpos anti*amiba* (Markell *et al.*, 1999).

El reservorio principal de la enfermedad es el hombre, aunque se han encontrado *amibas* en monos, perros, gatos y ratas, pero sin capacidad invasiva. La enfermedad es transmitida por los portadores asintomáticos o por los pacientes con diarrea aguda. La forma de transmisión es diversa, pudiendo ser adquirida de las siguientes formas: a) consumo de agua contaminada con quistes maduros, b) ingesta de alimentos crudos o mal cocinados en contacto con aguas negras, c) manipuladores de alimentos o d) contacto sexual. Por otra parte las infecciones parasitarias son uno de los mayores problemas en personas infectadas con HIV en todo el mundo (Savioli *et al.*, 2002 y Moran *et al.*, 2005).



Figura 2. Distribución mundial de la amibiasis. En la mayoría de los países tercermundistas la amibiasis intestinal afecta a más del 5% de la población, en tanto que en el resto de estos países la amibiasis intestinal fluctúa entre el 1 y 5 %.

5.4. CICLO DE VIDA DE *Entamoeba histolytica*

El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* fue descrito por Dobell, 1928; incluye cuatro estadios consecutivos: trofozoito, prequiste, quiste y metaquiste. El humano es infectado cuando ingiere agua o alimentos contaminados con quistes maduros, los cuales atraviesan el lumen intestinal hasta llegar a la región del íleon terminal en donde inicia el proceso de desenquistamiento, durante este evento a partir de un quiste emerge un trofozoito multinucleado el cual inmediatamente sufre dos divisiones celulares, lo que al final representa la generación de ocho trofozoitos uninucleados, que alcanzan su máximo desarrollo en la región cecal (Pérez *et al.*, 2002).

Los trofozoítos pueden convertirse en trofozoítos prequísticos los cuales presentan uno o dos núcleos, contienen agregados de ribosomas, llamados cuerpos cromatoides, también contiene vacuolas alimenticias, en esta etapa el núcleo sufre rápidamente dos divisiones seguidas, lo cual da origen a un quiste tetranucleado maduro, el cual es eliminado fuera del colon a través de las heces fecales formadas no diarreicas; en esta etapa tanto los cuerpos cromatoides como las vacuolas de glucógeno no pueden ser observadas (Clark y Diamond, 2002; Garcia y Buckner, 1997 y Katz *et al.*, 1989). Los quistes pueden sobrevivir fuera del hospedero por semanas o meses, especialmente bajo condiciones de humedad (Markell *et al.*, 1999), pero rápidamente se destruyen a -5°C y por encima de 40°C (Ivey, 1980). Los quistes no son invasivos, pero los trofozoítos pueden penetrar la mucosa gastrointestinal y posteriormente pueden emigrar e invadir otros órganos, causando infecciones extraintestinales.

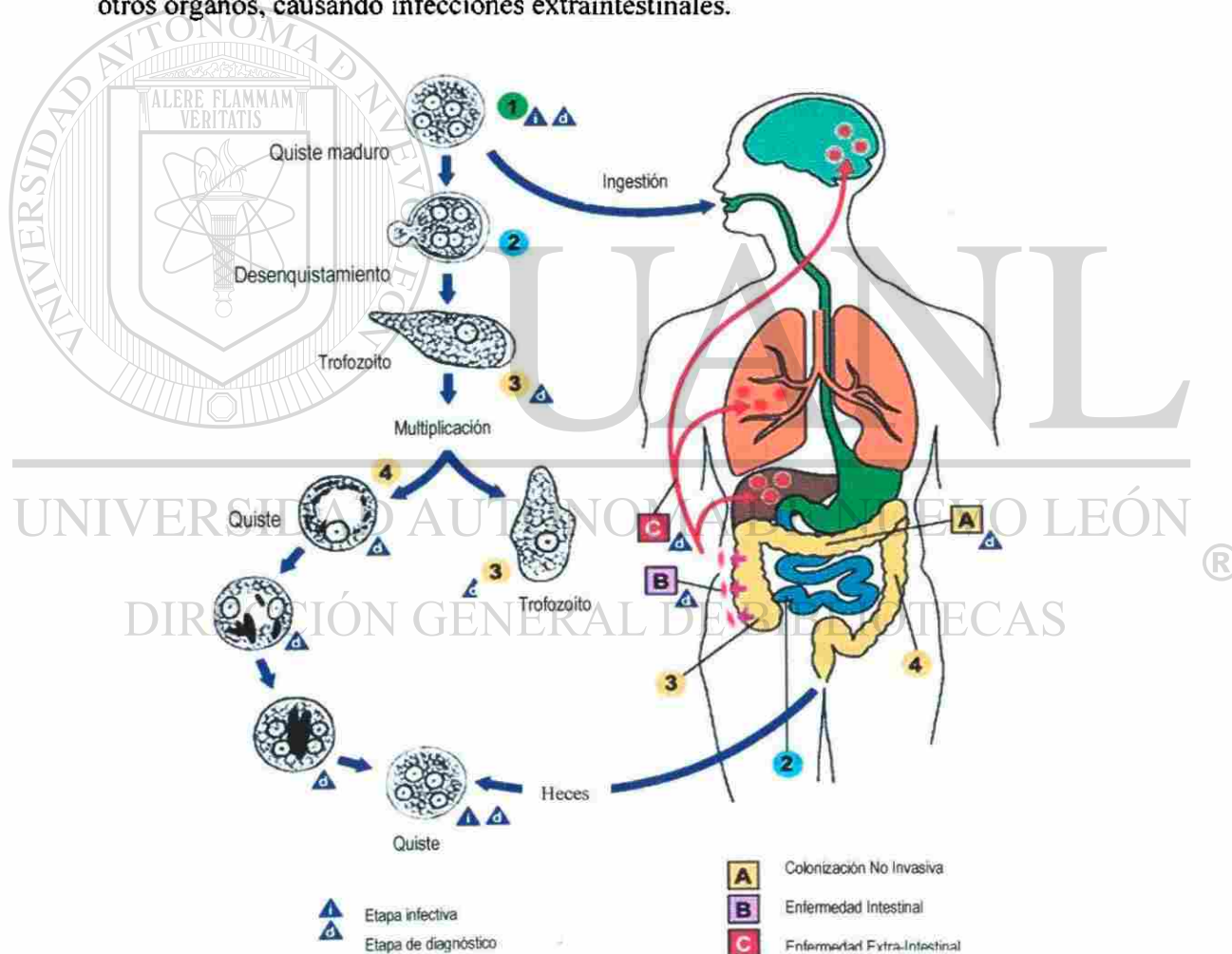


Figura 3. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. 1.-Los quistes maduros tetranucleados son eliminados a través de las heces y son ingeridos a través de agua o alimentos contaminados, 2.-El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado, 3.-A partir de cada quiste emergen ocho trofozoítos metaquísticos, 4.-A nivel de colon descendente ocurre el enquistamiento, los trofozoítos que atraviesan la mucosa intestinal (B) pueden diseminarse vía porta (C) al hígado, pulmón o cerebro y ocasionar amebomas.

5.5. BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica presenta importantes diferencias metabólicas con respecto a otros organismos eucariotes, tanto en lo que respecta al metabolismo glucídico ya que emplea pirofosfato en lugar de ATP como donador de fosfato (McLaughlin y Aley, 1985) como el metabolismo lipídico (ya que sintetiza ceramidas muy específicas), en el metabolismo proteico (presenta síntesis elevada de ácido glutámico, cisteína y prolina) y en el metabolismo nucleotídico (es incapaz de sintetizar purinas *de novo*). Aún que *E. histolytica* no presenta los organelos típicos de las células eucariotes superiores, está bien caracterizado que en su citoplasma presenta múltiples estructuras muy variables de tamaño (entre 0.5-9.0µm de diámetro) las cuales presentan diferente morfología y función denominadas vacuolas fagocíticas, macro y micropinocíticas, autofágicas, cuerpos residuales y lisosomas los cuales difieren de aquellos de otras células eucariotas en que las enzimas se encuentran unidas a la membrana y no libres en el compartimento vacuolar. Sin embargo, la naturaleza y función de otras vesículas presentes en el citoplasma aún no se conocen (Martínez, 1986).

Una serie de estudios acerca de la biología celular de *E. histolytica* han permitido identificar los principales zimodemos en base a la presencia de varias isoenzimas como la hexoquinasa, glucosafosfato-isomerasa, fosfoglucomutasa, y L-malato NADP-oxidoreductasa (Sargentum *et al.*, 1978); mediante el empleo de anticuerpos monoclonales se ha corroborado la presencia de moléculas en la membrana de *E. histolytica* entre las cuales se encuentran la adhesina Gal-GalNac (Petri *et al.*, 1990), un antígeno de superficie de 96 kDa (Torian *et al.*, 1990), un antígeno proteínico interno de 81-84 kDa (González *et al.*, 1992), una proteína hidrofílica de membrana de 29 kDa/30kDa (Reed y Flores, 1992), así como un antígeno aislado de los gránulos electrodensos (EDG) producidos al interactuar trofozoítos de *E. histolytica* con colágeno *in vitro*.

La principal fuente de energía de *E. histolytica* son los glúcidos, que son transportados desde el exterior y catabolizados por metabolismo fermentativo, siendo el etanol el producto final en condiciones anaeróbicas. *E. histolytica* es un organismo aerotolerante, el cual puede utilizar oxígeno como aceptor final de electrones. Sin embargo la presencia de altas concentraciones de oxígeno es nociva, ya que no posee sistemas enzimáticos implicados en la destoxificación de los radicales libres (ej. catalasa o glutatión), (Pérez-Arellano *et al.*, 2002), también carece de las enzimas dependientes del glutatión (Fahey *et al.*, 1984).

La movilidad de *E. histolytica* depende de su citoesqueleto, formado principalmente por actina, la cual se ha observado no sólo concentrado en la membrana plasmática, sino también en los pseudópodos y estomas fagocíticos y varias proteínas accesorias (miosina I, miosina II, prolina, vinculina y β-actinina), la movilidad implica tres procesos: a) extensión de un pseudópodo, b) unión a la superficie mediante una placa adhesiva (principalmente fibronectina) y c) desplazamiento del resto de la célula hacia la superficie (Martínez, 1986).

La organización del genoma y de los elementos promotores, también es muy peculiar, ya que el tamaño del genoma es relativamente pequeño para un organismo eucariota (3.2×10^7 pb) y un peso de 0.5 pg por núcleo, con un alto contenido de adenina/timina (A/T), y escasa presencia de intrones. Todo el DNA se encuentra dentro del núcleo, pero presenta varias copias de RNAr como elementos circulares extracromosomales. Las regiones ricas en RNA se encuentran distribuidas hacia la periferia del núcleo (Byers, 1986).

Recientemente un grupo de científicos han reportado el genoma completo de *Entamoeba histolytica*, el contenido del genoma de este parásito ha sorprendido a muchos científicos ya que el análisis del mismo revela la degradación del genoma de *E. histolytica* y su transición de organismo vivo libre a parásito en el tracto intestinal humano; lo cual implica que *E. histolytica* puede haber manipulado aspectos de su metabolismo, perdiendo genes propios de los protozoarios y haber adquirido algunos propios de las bacterias, a través de una transferencia lateral y se ha constatado que el genoma secuenciado contiene una amplia variedad de genes de organismos complejos (Loftus *et al.*, 2005).

5.6. MÉTODOS DE CULTIVO Y ENQUISTAMIENTO PARA *E. histolytica*

5.6.1. Métodos de cultivo

Desde el descubrimiento de *Entamoeba histolytica* (Lösch, 1875), han existido dos periodos desde el punto de vista histórico, el primero de 1890 a 1918, en el que sólo se hicieron tentativas de cultivo, y el segundo de 1918 a la fecha, es en este periodo en el cual ya se tienen bien establecidos los sistemas de cultivo, pero no así para reproducir el ciclo de vida completo bajo condiciones axénicas *in vitro*, debido principalmente a la falta de un medio o método que induzca el enquistamiento de *E. histolytica* con éxito.

A lo largo de la historia han existido tres sistemas de cultivo para *E. histolytica*: el cultivo xénico, en el cual el parásito es cultivado en presencia de flora indefinida; el sistema de cultivo monoxénico, en el cual el parásito es cultivado en presencia de una sola especie en particular y el sistema de cultivo axénico, en el cual el parásito es cultivado en ausencia de cualquier tipo de célula.

El primer método de cultivo reproducible para *Entamoeba histolytica* fue reportado por Boeck y Drbohlav, 1925; ellos desarrollaron dos medios difásicos el LES o LE, el cual estaba formado por una base de huevo en tubo inclinado, a la que se le agregaba una solución salina isotónica como sobrenadante y suero estéril humano, y el medio LEA en el cual el suero sanguíneo fue sustituida por albúmina cristalizada, ambos cultivos se efectuaron en presencia de flora entérica humana de composición desconocida, en estos medio fue posible mantener cultivos de *E. histolytica* por años, y posteriormente se introdujeron el uso de harina de arroz como fuente de carbohidratos (Dobell y Laidlaw, 1926).

Cleaveland y Sanders en 1930, reportaron el primer cultivo monoxénico en el cual emplearon agar con infusión de hígado cubiertos con suero salino y harina de arroz formando un medio en el cual tuvieron éxito en obtener cultivos puros de *Entamoeba histolytica* libre de bacterias, los cuales fueron obtenidos de absceso amibianos del hígado, producidos experimentalmente en gatitos, hallaron que en tales cultivos ocurría la reproducción de las amibas, y que los organismos permanecían vivos en los cultivos por no más de 14 días, ya que no se pudo mantener cultivos de *E. histolytica* indefinidamente.

Frye y Melenay en 1939, desarrollaron una mejora importante al sustituir el suero por extracto de hígado en el medio de cultivo para *E. histolytica*. Posteriormente, Balamuth, 1946; describió el primer medio monofásico, este medio era líquido y para que las amibas crecieran y se multiplicaran fue necesaria la asociación con otros comensales y la adición de almidón de arroz. Inicialmente sólo se utilizó infusión de yema de huevo pero al adicionar extracto de hígado, se encontró un incremento en el número de células. Nelson, 1947; desarrolló un método de preparación de un medio favorable para *E. histolytica* a base de extractos alcohólicos, de varios tejidos frescos y también de yema de huevo, encontrando que éste medio resultaba ser muy bueno para aislar a este parásito y para el mantenimiento de la cepa.

El primer cultivo axénico de una especie de *Entamoeba* fue obtenido por Stoll, 1957; quien obtuvo crecimiento de *E. invadens* en un medio que estuvo libre de cualquier otro tipo de células. Stoll inició estos cultivos con *E. invadens* que fue cultivada en una muestra de suero-salino conteniendo un pedazo de hígado fresco estéril, él mantuvo a la cepa en este medio libre de células por aproximadamente cinco años por transferencia de la amiba a tubos con medio fresco.

Un medio simple para crecimiento axénico de *E. invadens* fue desarrollado por Mc Connachie, 1962; quien sustituyó el suero por un digerido seco de hígado de res y así el medio pudo ser esterilizado. Diamond, 1961; tuvo éxito al conseguir crecimiento de *E. histolytica* axenicamente en un medio difásico suplementado con extracto de embrión de pollo y posteriormente diseñó un nuevo medio monofásico al cual llamó TPS-1 (Diamond, 1968), este medio estaba compuesto por tripticasa de caseína, PANMEDE (un hidrolizado de hígado) y complementado con suero de caballo. Éste medio permitió por primera vez el cultivo masivo de *E. histolytica*. Dado que el PANMEDE producía rendimientos muy variables, posteriormente se formuló el medio TYI-S-33 (Diamond, 1978), un medio más efectivo que el TP-S-1, ya que producía rendimientos más altos y menos variación en los resultados, el PANMEDE se sustituyó por extracto de levaduras, suplemento de hierro, vitamina B₁₂, ácido tióctico y tween 80.

En el medio TYI-S-33 se observó que la calidad de los cultivos de *E. histolytica* depende de la composición de los lotes de extractos de levaduras por lo que se diseñó el medio PEHPS (Saíd *et al.*, 1988), el cual presenta ventajas en la reproducibilidad de sus rendimientos, pueden desarrollarse cultivos a partir de inóculos tan bajos como un trofozoito/mL y se puede almacenar durante nueve meses a temperatura ambiente.

Posteriormente desarrollaron un medio de cultivo parcialmente definido llamado PDM-805 (Diamond y Cunnick, 1991) el cual no contenía suero y estaba constituido principalmente por aminoácidos, carbohidratos, vitamina B, precursores de ácidos nucleicos, un factor de crecimiento aislado de la tripticasa, seroalbúmina bovina y una solución de lipoproteína-colesterol. En este medio se veía disminuida la actividad tóxica de la amiba, lo cual al parecer se debía a la presencia de seroalbúmina.

Mata *et al.*, 1996; describieron una solución que reemplaza al suero en un cultivo axénico de protozoarios, al cual denominaron PACSR (Protozoa Axenic Cultivation Serum Replacement). Este medio combinado con PEHP o TYI produce muy buenos resultados en el cultivo de *E. histolytica* en ausencia de suero; así como en el cultivo y enquistamiento *in vitro* de *Entamoeba invadens* (Barrón *et al.*, 2005).

A partir de que se describió el medio TP-S-1 para el cultivo axénico de trofozoítos de *E. histolytica* (Diamond, 1968), se ha avanzado en el conocimiento de la biología celular y molecular de los trofozoítos, pero no así para los quistes y su proceso de diferenciación.

5.6.2. Métodos de Enquistamiento

A pesar de que se sabe que el quiste es la forma infectiva de este parásito, la diferenciación de los trofozoítos de *E. histolytica* a quistes, así como el desenquistamiento, son aspectos de la biología del parásito que han sido muy poco estudiados debido a la falta de un medio o método que permita la inducción del enquistamiento de este parásito bajo condiciones axénicas *in vitro*.

Al parecer Dobell y Laidlaw, 1926; fueron los primeros en producir el enquistamiento bajo condiciones xénicas de *E. histolytica* empleando el medio difásico LE de Boeck y Drbohlav, aunque con “resultados inciertos”, de sus trabajos dedujeron que para obtener buena cantidad de quistes eran importantes tres cosas: el medio, la flora bacteriana y harina de arroz. Posteriormente Cleveland y Sanders, 1930; empleando dos diferentes medios difásicos los cuales consistían en agar inclinado con infusión de hígado, cubierto con suero salino o harina de arroz, en estos medios además de obtener cultivos puros de *Entamoeba histolytica* obtuvieron quistes, llegando a completar todo su ciclo de vida. Una vez que los quistes maduraban (quistes tetranucleados) estos desenquistaban, llegando a existir simultáneamente en el cultivo división mitótica, crecimiento y enquistamiento; en tres experimentos obtuvieron trofozoítos móviles, pero ninguno de ellos vivió más de seis días. Finalmente, concluyeron que al menos son necesarias tres cosas para que el enquistamiento tenga lugar: 1) crecimiento rápido y multinucleación de las amibas por 24 h o más sin subcultivarlas hasta que llegan a ser abundantes, 2) la presencia de harina de arroz, almidón de arroz o polvo de arroz en el medio para alimentar a las amibas y 3) la presencia de ciertas bacterias en el medio.

Stone en 1935, reportó un medio para enquistar a *E. histolytica* el cual consistía de sales inorgánicas (solución de Locke) adicionada con flúor. Kessel *et al.*, 1944; reportaron el enquistamiento de *E. histolytica* al modificar el medio de Cleaveland y Sanders. Zuckrman y Melenay, 1945; reportaron abundante producción de quistes bajo una atmósfera reducida en un medio líquido. Chang, 1946; reportó el más completo estudio de los factores físico-químicos involucrados en el enquistamiento de *E. histolytica*, especialmente el papel que tiene el pH y el potencial de oxido-reducción. Según Chang las mejores condiciones para el enquistamiento se dan en un rango de pH bajo (6.4 a 6.8).

El enquistamiento de *Entamoeba histolytica* se ha observado solamente en cultivos polixénicos o monoxénicos, pero hasta ahora no se ha podido enquistar bajo condiciones axénicas (ver Tabla II); este hecho ha dificultado el conocimiento de los factores bioquímicos involucrados en la diferenciación celular y en su ciclo celular. Ante la dificultad de obtener quistes de *E. histolytica* en cultivos axénicos, la mayoría de los investigadores han empleado a *Entamoeba invadens* que sí puede ser enquistada *in vitro* en cultivo axénico para estudiar el proceso de enquistamiento y el desenquistamiento con la idea de extrapolar estos resultados a *E. histolytica* (López y Villagómez, 1993). Sin embargo, dentro de la familia Endamoebidae. *E. invadens* y *E. histolytica* son grupos filogenéticamente distintos como lo demuestran estudios basados en la secuencia de genes del RNA (Silberman *et al.*, 1999), por lo tanto los datos obtenidos al respecto no son extrapolables con certidumbre a *Entamoeba histolytica*.

En las últimas décadas se han logrado avances en el estudio del enquistamiento gracias a distintos medios que promueven el enquistamiento masivo *in vitro* de *E. invadens* (Rengpein y Bailey, 1975; Das *et al.*, 1980; Avron *et al.*, 1986; Said *et al.*, 1988; Thepsurangikul *et al.*, 1971; Nayeem *et al.*, 1993, y Morales y Villarreal, 1997). Sin embargo al repetir estos experimentos con *E. histolytica*, no se ha tenido éxito, hasta ahora.

Rivera y Correa en 1986, reportaron que *E. histolytica* puede ser enquistada axenicamente *in vitro* empleando el medio TYI-S-33 adicionado con tioglicolato, por otra parte Mata y Saíd, 1986; reportaron la inducción de estructuras con pared celular sin llegar a formar verdaderos quistes al emplear el medio PEHPS, Campos *et al.*, 2004; emplearon este mismo medio enriquecido con los iones Mn^{+2} , Mg^{+2} y Co^{+2} los que al parecer favorecen la síntesis de pared. Otro medio que favorece la formación de altos porcentajes de quistes (60-74%) es el medio de Boeck y Drbohlav adicionado con glucosa e histamina de acuerdo con Nayeem *et al.*, 1993.

Tabla II

Medios desarrollados para inducir el enquistamiento de *Entamoeba histolytica* in vitro

| Autor | Fecha | Tipo de medio | Condición | Descripción |
|---|--------------|--|-----------|---|
| Dobell y Laidlaw | 1926 | Difásico (Base de huevo/harina de arroz/ sol. de Locke) Medio LE de Boeck&Drbohlav | Xénica | Consiste en cultivar <i>E. histolytica</i> en medio que no contienen almidón de arroz por varios pases, después de lo cual se añade el almidón de arroz al medio de cultivo. Resultados inciertos |
| Cleveland y Sanders | 1930 | Difásico (Agar/harina de arroz/ solución de Locke) | Xénica | Para un buen resultado en el enquistamiento recomiendan el uso de abundantes amibas, la presencia de harina, almidón o polvo de arroz en el medio para alimentar a las amibas y la presencia de bacterias en el medio. |
| Stone, W.S. | 1935 | Monofásico (Medio suero-huevo-solución de Locke) | Xénica | Reportó un medio para enquistar a <i>E. histolytica</i> el cual consistía de sales inorgánicas (solución de Locke modificada) y adicionado con suero de caballo. |
| Kessel <i>et al.</i> | 1944 | Difásico | Xénica | Modificaron el medio de Cleveland y Sanders |
| Luckman y Melenay. | 1945 | Monofásico | Xénica | Reportaron abundante producción de quistes bajo una atmósfera reducida en un medio líquido. Cepa: NIH |
| Chang. | 1946 | Difásico (Base de huevo/harina de arroz/ sol. de Locke) Medio LE de Boeck&Drbohlav | Xénica | Reportó el papel que tiene el pH y el potencial de oxidación-reducción, dedujo que las mejores condiciones para el enquistamiento se presentan en un rango de pH bajo (6.4 a 6.8) |
| Rivera P.R. y Correa-Lemus, I. | 1986 | Monofásico Medio TYI-S-33 | Axénicas | Modificaron el medio TYI-S-33 (Diamond, 1978) al adicionarle TYI-S-33. |
| Mata-Cárdenas, B. D. & Saíd-Fernández, S. | 1986 1993 | Monofásico Medio PEHPS | Axénica | En este medio se induce la formación de estructuras quísticas metabólicamente activas pero "con una pared anormal e inmadura" sin llegar a formar verdaderos quistes. Cepa HK-9 |
| Nayeen M. A. | 1993 | Difásico (Base de huevo Solución de Locke) Medio LE | Axénica | Empleando el medio de Boeck y Drbohlav adicionado con glucosa e histamina se obtienen altos porcentajes de quistes (60-74%). |
| Morales-Vallarta, M., <i>et al.</i> | 1997 | Monofásico Medio TYI-S-33 o PEHPS | Axénica | En este método de se involucran alta tensión de CO ₂ , suero de bovino y ayuno de glucosa, se produce formas semejantes a quistes con paredes imperfectas, sin embargo su estructura interna presenta algunas características semejante a un quiste maduro de <i>E. histolytica</i> . Cepa: HMI-IMSS |
| Campos-Góngora, E., <i>et al.</i> | 2004 | Monofásico Medio PEHPS | Axénica | El medio PEHPS es enriquecido con los iones Mn ⁺² , Mg ⁺² y Co ⁺² los que favorece la síntesis de quitina. |
| Clark C.G. y Diamond, I.S. | 2002 | Difásico (Base de huevo/harina de arroz/ sol. de Locke) Medio LE de Boeck & Drbohlav | Xénica | Método y resultados semejantes a los reportado por Dobell y Laidlaw en 1926. |

Morales y Villarreal en 1997, desarrollaron un método basado en alta tensión de CO₂ en los medios de cultivo TYI-S-33 y PEHPS en los cuales se forman estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. Las estructuras semejantes a quistes presentan cuerpos cromatoides, son uninucleados y son resistentes a sarcosyl 1% con un rendimiento del 16%. Este método de enquistamiento efectivo para *E. invadens* cuando se aplica a *E. histolytica* produce formas semejantes a quistes con paredes imperfectas, sin embargo su estructura interna presenta algunas características semejante a un quiste. En el método de enquistamiento se involucran factores tales como alta tensión de CO₂, suero estéril de bovino y ayuno de glucosa, pero hay otras sustancias que son sugestivas de inducir el enquistamiento en combinación con variantes, ya sea de la concentración de CO₂, suero o la concentración de iones activadores de la quitin sintetasa (Das y Guillin, 1991; Campos *et al.*, 2004). Empleando el medio de cultivo axénico PEHPS, se logró inducir la formación de quistes maduros de *Entamoeba histolytica* (HK-9), metabólicamente activos pero “con una pared anormal e inmadura” (Saíd *et al.*, 1993), y posteriormente reportaron la inducción *in vitro* de quistes de *E. histolytica* empleando el medio PEHPS modificado, los cuales observados a microscopía de luz “fueron muy similares a los naturales”, sin embargo cuando se observan por MET se aprecia que la pared está desprendida de la superficie lo cual indica la formación de una pared imperfecta y no desenquistaban cuando se colocaban en medio de crecimiento.

5.7. PARED CELULAR DE QUISTES DE *Entamoeba*

5.7.1 Composición

La composición química de la pared de quistes de las amibas del género *Entamoeba* no se ha esclarecido totalmente, aunque se ha reportado que la pared quística de *E. invadens* está formada por un complejo de proteínas-carbohidratos (Mc Conachie, 1969) y posteriormente se demostró que el componente mayoritario de la pared de quistes de *E. invadens* es la quitina la cual es un polímero de N-acetil-D-glucosamina con enlace $\beta(1-4)$ (Arroyo *et al.*, 1980). Mata *et al.*, 1996; desarrollaron un medio en el cual se forman estructuras con un pared resistente al sarkosyl al 0.1% y encontraron que la pared es parecida a la de otros protozoarios como *E. invadens*, *Acanthamoeba castellanii* y *Giardia lamblia*. la cual está formada principalmente por quitina.

5.7.2. Estructura

Las características estructurales generales de la pared quística de protozoarios patógenos de los géneros *Entamoeba*, *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Giardia* son los siguientes: a) están formados por una o dos capas, una de ellas formada principalmente de polisacáridos, b) los polisacáridos sirven como matriz y dan rigidez y resistencia a la pared, c) sobre la matriz de polisacáridos se originan diversos lipopolisacáridos y glicoproteínas y d) los polisacáridos normalmente se encuentran formando capas superpuestas. La pared de los quistes de *E. invadens* formados en condiciones axénicas

resisten el efecto del duodecilsulfato de sodio (SDS) al 1% (Arroyo *et al.*, 1980). La pared del quiste mide 0.125 a 0.150 μm de grueso (Chávez, 1978, vista al microscopio electrónico de transmisión, está constituida por fibrillas de 2 a 3 μm de diámetro, se disponen en varias capas concéntricas y llegan a formar una gruesa malla (Martínez y Espinosa, 2003). Por determinaciones químicas y estudios de difracción de rayos X, se ha comprobado la presencia de quitina en la pared de quistes de *Entamoeba invadens* (Arroyo *et al.*, 1980). Recientemente los genes que codifican para quitinasas de *E. invadens*, *Entamoeba coli* y *E. histolytica* han sido clonados pero su expresión ha sido detectada únicamente en el enquistamiento de *E. invadens* (Clarck *et al.*, 2000).

La función de la pared quística es la de proteger a la célula en criptobiosis de condiciones de hipoosmolaridad y de otros factores desfavorables, como el efecto de sustancias tóxicas (Neff y Benton, 1964 y Arroyo *et al.*, 1980).

5.8. QUITINA

Quitina (del griego *chiton* = túnica) es el constituyente esencial de la pared celular de grandes grupos de hongos (basidiomicetos, ascomicetos y zigomicetos), también forma esqueleto externo de los artrópodos y otros grupos animales. La quitina es un homopolímero no ramificado del azúcar N-acetilglucosamina (Glc-Nac) unidos por enlaces $\beta(1-4)$, similar en estructura a la glucosa, pero que contiene un grupo acetilamina en vez de un grupo hidroxilo enlazado al segundo átomo del anillo.

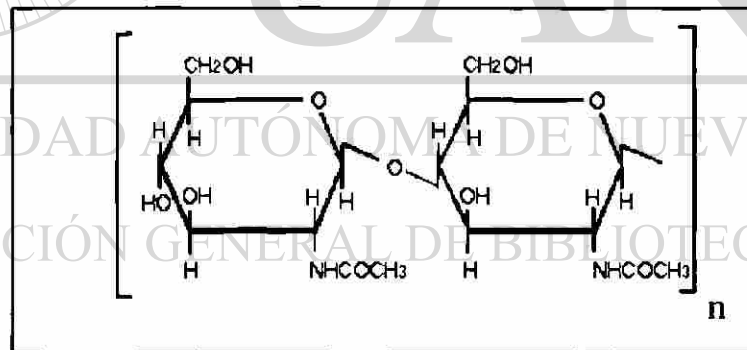


Figura 4. Estructura química de la quitina. Polímero de N-acetilglucosamina que muestra el enlace $\beta(1-4)$.

La quitina es un material estructural ampliamente distribuido entre los invertebrados, particularmente en la pared celular de hongos y quistes y en la cubierta (exoesqueleto) de algunos animales pluricelulares como insectos, arañas y crustáceos.

En los hongos la biosíntesis y deposición de quitina durante la síntesis de pared es un proceso muy complejo, no completamente entendido. Este proceso involucra la biotransformación secuencial de metabolitos simples, polimerización de intermediarios biosintéticos y transporte de producto al exterior de la membrana plasmática (Batchricki, 1989).

5.8.1. Síntesis de quitina en pared celular de quistes de amibas

Para la polimerización de la quitina se requiere de la presencia de quitin-sintetasa un grupo de enzimas pertenecientes a la familia de β -glycosil-transferasas, esta enzima se ha descrito en hongos, insectos y nematodos, recientemente se han reportado dos genes (EhCHS1 y EhCHS2) que codifican quitin-sintetasa en *E. histolytica* (Campos *et al.*, 2004). La quitin-sintetasa (también es conocida como UDP-2 acetamido-2-deoxi-D-glucosaquitina 4-beta-acetamidodeoxiglucosil-transferasa) requiere la presencia de iones catiónicos divalentes Mg^{+2} , Mn^{+2} y Co^{+2} como cofactores (Horst, 1981). Aún no se sabe si se requiere un oligosacarido corto como iniciador de la reacción. Cada ciclo catalítico involucra la translocación del polímero de quitina en crecimiento de los sitios de unión de la quitin-sintetasa C el sustrato después de las dos adiciones de GlcNac. El polímero de quitina permanece de esta manera unido a la enzima, preparado para el siguiente ciclo catalítico. El ensamble de la quitina ocurre sin la formación de quito-oligosacaridos libres (Horsch y Sopwdhamini, 1996).

Existen reportes de la formación de glicolípidos unidos a GlcNac (GlcNac-glicosildiácilglicerol) que actúan como intermediarios de la síntesis de quitina y quito-oligómeros unidos a dolicolfosfato con una cadena de ocho residuos de longitud máxima, el cual parece ser transferido a un aceptor polipeptídico y actuar como un sustrato aceptor de GlcNac para la enzima quitin-sintetasa, lo cual indica que la quitin-sintetasa actúa unida covalentemente a un sustrato iniciador. Se desconoce hasta ahora si el supuesto complejo quitin-sintetasa-sustrato iniciador y al sitio de unión a UDP-GlcNac implicados en los eventos de elongación de la cadena de quitina les correspondan distintas regiones del mismo polipéptido o están situados en dos diferentes polipéptidos estrechamente asociados (complejo multienzimático), (Merz *et al.*, 1999). Para que la quitina sintetizada cumpla con sus funciones en los sistemas biológicos, deberá haber un mecanismo que transporte el polímero de quitina sintetizada *de novo* desde el interior de la célula hacia en donde probablemente se encuentre el dominio catalítico de la enzima, hacia el medio extracelular y probablemente también deberá haber un número de pasos post-síntesis en la superficie celular involucrando la formación de fibras de quitina, asociación de estas con proteínas cuticulares y finalmente la formación de una estructura macromolecular quitina/proteína con extensas modificaciones químicas. Por lo que se asume que la formación de fibras de quitina es un proceso extremadamente complejo y pobremente entendido (Tellam *et al.*, 2000)

Das y Guillin en 1991, demostraron la presencia de dos formas de quitina sintetasa en *Entamoeba invadens*: Una forma soluble y una forma particulada y se sugirió que esta enzima podría ser esencial para la formación de la pared quística de *E. invadens*. El 60% de la actividad enzimática de la quitina-sintetasa se encuentra en forma soluble, su mayor actividad la presenta a un pH de 6.0; el 40% restante de la actividad enzimática se encuentra en forma particulada y su mayor actividad es a pH entre 7.0 y 7.5, la actividad de ambas fracciones depende de la presencia de Mg^{+2} , Mn^{+2} y Co^{+2} . Por otra parte Chang, 1946; señaló que el pH de 6.8 a 7.1 es ideal para el enquistamiento de *E. histolytica*.

Recientemente, se ha reportado que en la síntesis de la pared celular de *Entamoeba histolytica* se encuentran relacionadas dos quitina-sintetasa (Chs), la EhChs-1 es exclusiva hasta ahora de este parásito y la EhChs-2 la cual se encuentra también en insectos y nematodos (Van Dellen *et al.*, 2006).

5.9. DESENQUISTAMIENTO DE *Entamoeba histolytica*

El desenquistamiento no axénico de *Entamoeba histolytica* se ha observado *in vitro* en condiciones que se aproximan a las que encuentra esta amiba en el aparato digestivo del huésped, ya que una vez que el quiste maduro llega a la boca y es deglutido, atraviesa el estómago en el cual aparentemente no experimenta cambios en condiciones ácidas, pero al encontrar un ambiente neutro o ligeramente alcalino entra en gran actividad y muy probablemente en combinación con los jugos gástricos aparentemente es favorable para desencadenar el proceso de desenquistamiento, en el cual a partir de un quiste tetranucleado emerge hacia el exterior (a través de una pequeña hendidura que se encuentra en la pared) un trofozoito multinucleado (trofozoito metaquístico) del cual se derivan cuatro pequeñas amibas, las cuales sufren rápidamente una división nuclear y celular para dar origen a ocho tofozoitos.

En algunas especies de protozoarios, el quiste está provisto de un poro u opérculo de salida del trofozoito (trofozoito metaquístico) y en otras especies es requisito indispensable la disolución de la pared por acción enzimática o bien su ruptura (Monwell, 1968). Durante el desenquistamiento de *E. invadens*, se ha descrito por microfotografía espaciada que la emergencia del trofozoito metaquístico ocurre a través de un poro en la superficie de la pared (Cervantes y Martínez, 1980; López y Villagómez, 1993).

El desenquistamiento de *Entamoeba histolytica*, hasta ahora sólo se ha reportado en medios xénicos, de acuerdo con los trabajos de Cleaveland y Sanders, 1930; Stone, 1935; Snyder y Melenay, 1941; además reportaron también el desenquistamiento de *E. histolytica* en "presencia de agentes reductores o en una condición de anaerobiosis que se produce por agotamiento parcial del oxígeno molecular del medio", los agentes reductores empleados fueron el clorhidrato de cisteína, ácido tioglicólico neutralizado, también tuvieron éxito al emplear en su método la aereación con nitrógeno y la absorción de oxígeno con pirogalol alcalino, concluyendo en su trabajo que el agotamiento total de oxígeno no es esencial para el desenquistamiento.

A la fecha sólo hay evidencia de enquistamiento y desenquistamiento de *E. histolytica* en presencia de bacterias. El hecho de que pueda ser inducida la formación de estructuras semejantes a quistes modificando y combinando algunos factores del medio en un cultivo xénico, indica que es posible encontrar condiciones de cultivo que puedan inducir el ciclo de vida axénico *in vitro* de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas, como sucede con *Entamoeba invadens* (ver tabla III).

Tabla III

Inducción del desenquistamiento xénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*

| Autor (es) | Fecha | Quistes obtenidos de: | Quistes resistentes a: | Condiciones del medio para desenquistar | Descripción |
|----------------------|-------|---|--|--|--|
| Cleaveland y Sanders | 1930 | *Muestras diarreicas de paciente *Quistes producidos <i>in vitro</i> | Bicloruro de mercurio al 1:10,000 | Medios conteniendo bacterias | Se obtuvieron trofozoitos móviles, pero ninguno de ellos vivió más de seis días. |
| Snyder y Melenay | 1941 | *Muestras diarreicas de paciente | Bicloruro de mercurio al 1:50,000 45 min | *Medios libre de bacterias * Medios conteniendo bacterias | Los quistes desenquistaron en medios que contienen bacterias, pero no se desenquistaron en los medios esteriles. |

5.10 ULTRAESTRUCTURA DE TROFOZOITOS Y QUISTES DE *Entamoeba*

El primer estudio al microscopio electrónico de amibas de *Entamoeba invadens* crecidas axenicamente fue realizado por Siddiqui y Rudzinska, 1965; quienes describieron aspectos referentes a la membrana citoplasmática, membrana nuclear y detalló los hallazgos citoplásmicos, en el cual se destaca la ausencia de mitocondrias y aparato de Golgi, entre las estructuras citoplasmáticas que resalta se encuentran los cuerpos cromatoides los cuales describe como característicos de quistes, prequistes y trofozoitos con lento o nulo crecimiento. Posteriormente, Barker y Deutsch en 1958; en un estudio realizado por medio de microscopía electrónica y estudios histoquímicos demostraron que los cuerpos cromatoides en trofozoitos de *E. invadens* crecidos en un medio no axénico, consisten principalmente de ácido ribonucleico y proteínas inespecíficas, calcularon en 200Å el diámetro de las partículas que forman las hélices de los cuerpos cromatoides y un tamaño promedio de los cuerpos cromatoides de 0.5µm, aumentando éste con la edad del cultivo y decreciendo en el quiste.

En micrografías de quistes de *E. invadens* observadas a microscopía electrónica se observa polaridad de las vacuolas, así como de los núcleos y cuerpos cromatoides, lo cual indica una distribución especial para los organelos del quiste y es posible que este arreglo tenga alguna función con relación al desenquistamiento o alguna relación con una posible zona específica para el poro de salida del trofozoito metaquístico durante el desenquistamiento (Morales y Villarreal, 1997).

Estudios efectuados durante el proceso de enquistamiento y desenquistamiento *in vitro* de *Entamoeba invadens* empleando microscopía electrónica de barrido y de transmisión, reportan los siguientes hallazgos: durante el enquistamiento se observa una red fibrilar en la superficie de los prequistes, en cortes finos se observa la presencia de

vacuolas conteniendo microfibrillas de apariencia similar a los componentes de la pared de los quistes, al observar los prequistes en microscopía de fluorescencia se aprecian estructuras citoplásmicas redondeadas fluorescentes, en la etapa de quiste la fluorescencia se observa en la superficie y durante el desenquistamiento a través de microscopía electrónica de barrido (MEB o SEM) se observa el desprendimiento del metaquiste de la pared celular. Los metaquistes fagocitan material amorfo el cual posiblemente corresponda a residuos de la pared celular, en este proceso de desenquistamiento visto al microscopio electrónico de transmisión (MET) se aprecia un espacio entre la membrana celular y la pared celular e internamente se apreció abundante material electrodenso el cual posiblemente está relacionado con el proceso de desenquistamiento (Chávez *et al.*, 2003).

En *E. histolytica* se realizó un estudio con espectroscopía de rayos X del núcleo de trofozoítos, en el cual reporta la presencia de cuerpos intranucleares y cuya composición consta de fósforo, calcio y magnesio, esta composición es independiente de las condiciones de cultivo y composición del medio de cultivo (Feria y Tapia, 1977).

Empleando MET, se realizaron estudios ultraestructurales comparativos entre trofozoítos de *E. histolytica* recuperados de un absceso hepático y de trofozoítos de este mismo protozooario cultivados *in vitro*, los cuales evidencian que los primeros presentan una gran cantidad de gránulos periféricos electrodensos, además se aprecia una gran cantidad de vesículas citoplásmicas con un contenido microfibrilar; y empleando microscopía de fluorescencia se observó material semejante a quitina en estas vesículas, tal como se ha apreciado en *E. invadens* y *Giardia lamblia* (Chávez *et al.*, 2004).

5.11. EFECTO DE AGENTES QUÍMICOS SOBRE EL DESENQUISTAMIENTO *in vitro* DE *Entamoeba*

A la fecha se han realizado una serie de investigaciones empleando una gran diversidad de agentes químicos, encaminados a inhibir el crecimiento y diferenciación o desenquistamiento de *Entamoeba invadens* (Makioka *et al.*, 2004; Valdez *et al.*, 2000 y Calzado *et al.*, 2007) en el supuesto de que los resultados que se obtengan en este protozooario podrán ser aplicados al control de la amibiasis. Sin embargo, dentro de la familia Endamoebidae tanto *E. invadens* como *E. histolytica* se encuentran en grupos filogenéticamente diferentes como lo demuestran estudios basados en la secuencia de genes del RNA según Silberman *et al.*, 1999. Por lo tanto, los datos obtenidos en *Entamoeba invadens* no son totalmente extrapolables a *Entamoeba histolytica* (López y Villagómez, 1993).

En la actualidad existe la necesidad preponderante de contar con una droga que permita el control de la amibiasis ocasionada por *Entamoeba histolytica*, debido a que los medicamentos existentes actualmente contra la amibiasis provocan una serie de efectos secundarios indeseables en el humano, como los ocasionados por el metronidazol, el cual es considerada como la droga de elección de acción sistémica

7. RESULTADOS

7.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Entamoeba histolytica* IN VITRO

En la cinética de crecimiento de *E. histolytica*, empleando el medio de cultivo TYI-S-33 (Fig.10), se observa que durante las primeras 24 h presenta una ligera fase de adaptación, posteriormente se observa la fase logarítmica, alcanzando su rendimiento máximo a las 72 h, con un rendimiento de aproximadamente 138,000 cél/mL y posteriormente se observa un decaimiento paulatino en el número de células.

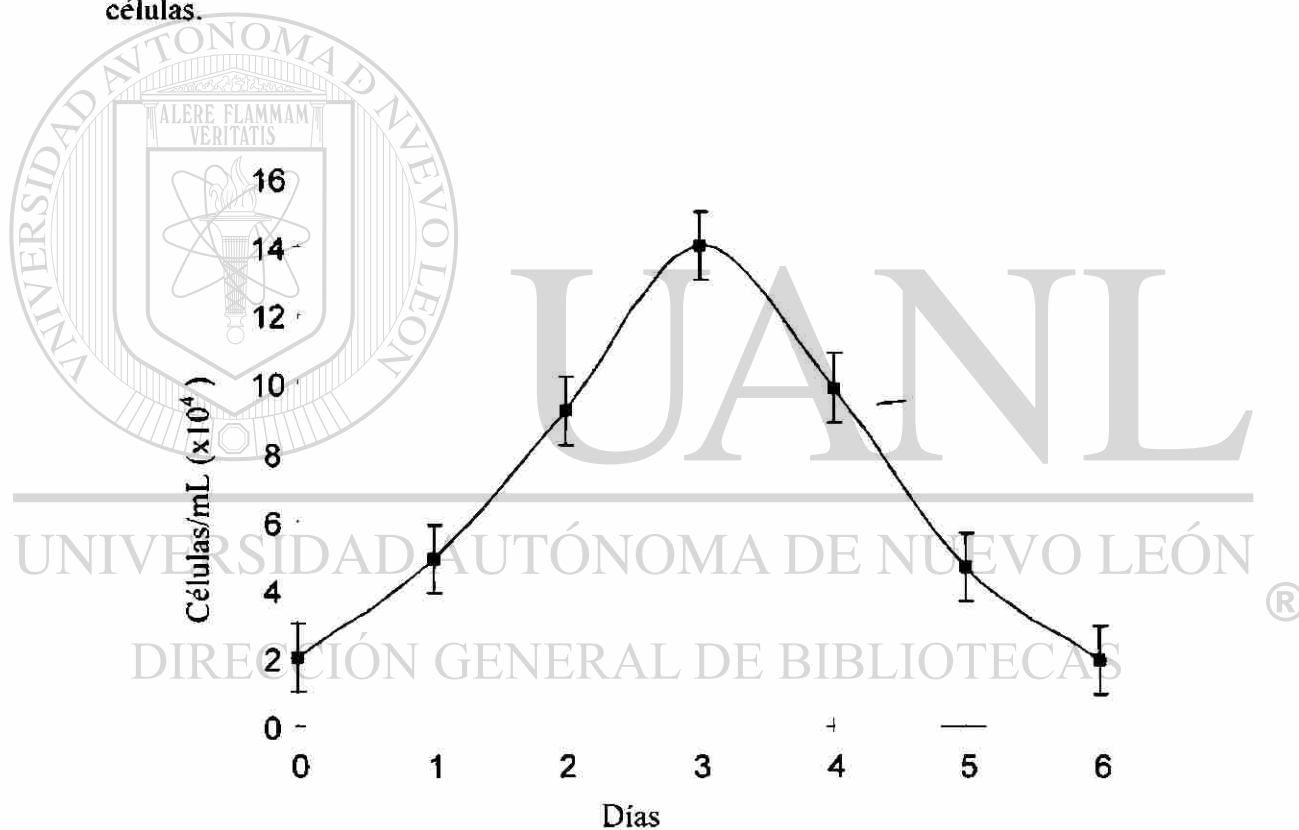


Figura 10. Cinética de crecimiento axénico de *E. histolytica* in vitro. Esta cinética fue realizada empleando el medio TYI-S-33, los resultados obtenidos son el resultado de tres eventos independientes triplicado, graficados como medias ± DS.

7.2 RENDIMIENTO DE ESTRUCTURAS SEMEJANTES A QUISTES DE *E. histolytica* OBTENIDAS BAJO CONDICIONES AXÉNICAS *IN VITRO*

De los diversos bioensayos realizados para inducir el enquistamiento axénico de *E. histolytica in vitro*, en la Tabla IX se muestra el rendimiento obtenido en cada uno de los bioensayos (ver Tabla VI y Fig. 6).

Tabla IX

Rendimiento de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* obtenido en los diversos bioensayos

| Número de bioensayo | Rendimiento de ESQ (%) |
|---------------------|------------------------|
| 1 | 68 |
| 2 | 73 |
| 3 | 56 |
| 4 | 63 |
| 5 | 86 |
| 6 | 93 |
| 7 | 52 |
| 8 | 74 |
| 9 | 86 |
| 10 | 74 |
| 11 | 83 |
| 12 | 90 |
| 13 | 34 |
| 14 | 70 |
| 15 | 90 |
| 16 | 95 |
| 17 | 66 |
| 18 | 47 |
| 19 | 87 |

El bioensayo 16 resultó ser el más efectivo para inducir estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. Además fue el único con el que se obtuvieron estructuras semejantes a quistes que pudieron desenquistar (ver sección 7.5 y figura 13).

7.3 CINÉTICA DE INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS SEMEJANTES A QUISTES DE *Entamoeba histolytica* IN VITRO BAJO CONDICIONES AXÉNICAS

Se llevó a cabo la inducción de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* *in vitro* bajo condiciones axénicas de acuerdo al bioensayo 16 de la Tabla VI y se realizaron lecturas cada 24 h por 7 días, los resultados se presentan en la figura 11. En estos resultados se observa la ausencia de estructuras semejantes a quistes durante los primeros 3 días de incubación a 37°C; sin embargo a partir del día 4 de incubación a las condiciones descritas, se obtuvo 24.9% de estructuras semejantes a quistes resistentes al detergente tritón X-100 [0.15%]/10 min, a temperatura ambiente, al día 5 de incubación se obtuvo un 70.2% de estructuras semejantes a quistes, al día 6 se obtuvo 90% y al día 7 se obtuvo 95.7% de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* resistentes al detergente antes especificado; los resultados obtenidos al día 6 y 7 muestran diferencia significativa entre sí, pero con respecto al rendimiento obtenido al día 4 y 5 se aprecia diferencia significativa muy marcada (ANOVA $p < 0.05$).

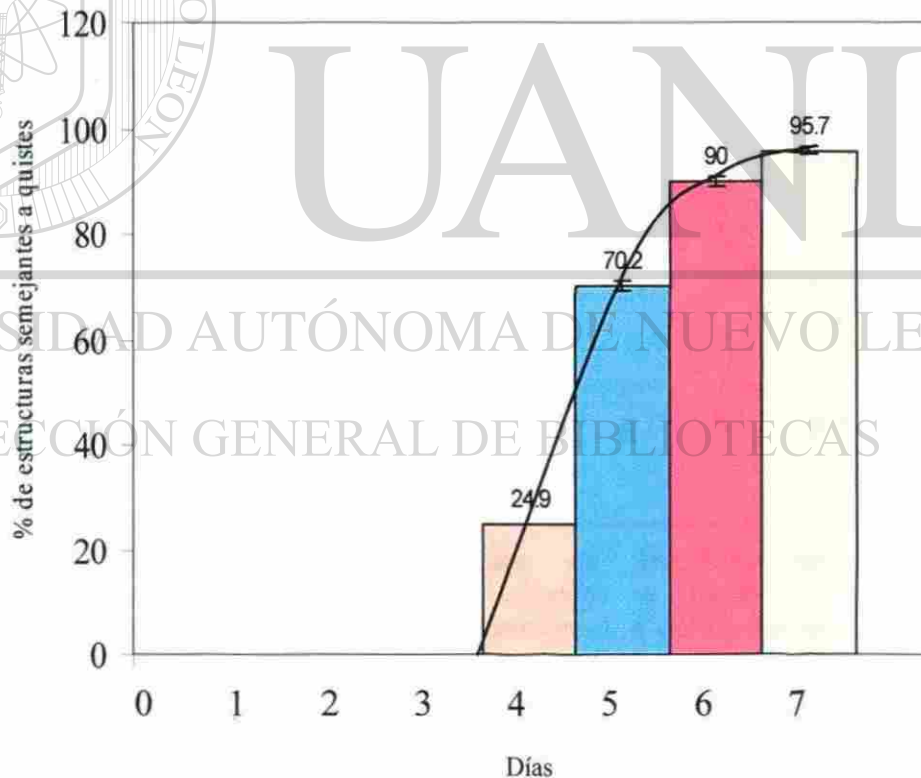


Figura 11. Cinética de inducción de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* *in vitro*. Esta cinética es el resultado de tres eventos independientes por triplicado, graficados como medias \pm DS.

7.4 DESEÑQUISTAMIENTO AXÉNICO *IN VITRO* DE LAS ESTRUCTURAS SEMEJANTES A QUISTES DE *Entamoeba histolytica*

A partir de las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* que se obtuvieron bajo condiciones axénicas *in vitro* se indujo el desenquistamiento empleando el medio TYI-S-33, los trofozoítos desenquistados presentaron un aspecto morfológico normal, una vez que se obtuvieron cultivos confluentes se realizó una cinética de crecimiento bajo condiciones normales. La cinética de crecimiento de los trofozoítos desenquistados (Fig.12, línea rosa) es el resultado de tres eventos independientes al igual que la cinética control es decir la cinética de crecimiento de los trofozoítos cultivados bajo condiciones normales (Fig.12, línea azul); en los resultados obtenidos se observa que durante los primeros 4 días de incubación a 37°C, tanto en la cinética control así como en la cinética de crecimiento de trofozoítos obtenidos a partir de las formas quísticas se observa un comportamiento similar, no presentando diferencia significativa en el rendimiento de células por mililitro (ANOVA $p < 0.05$).

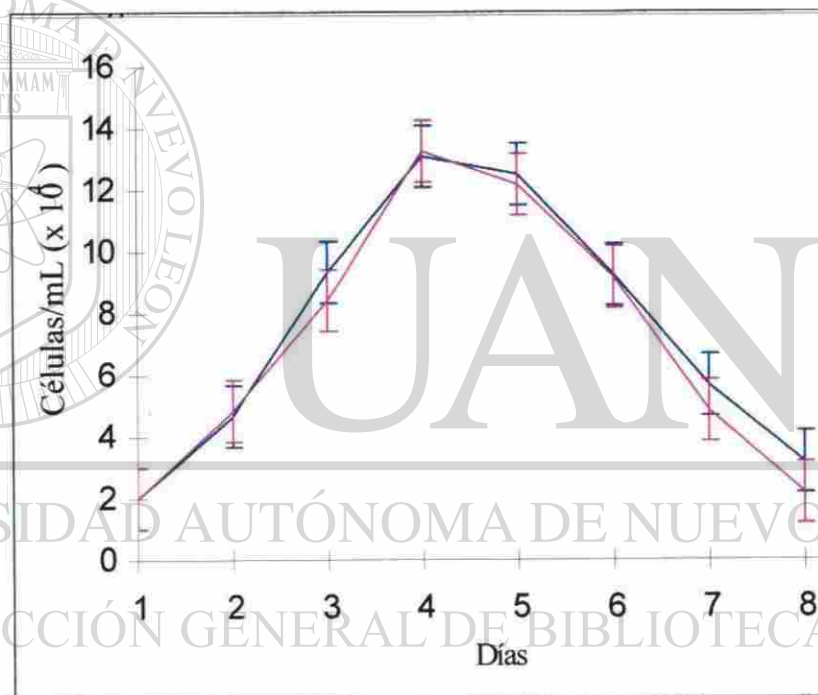


Figura 12. Cinética de crecimiento de trofozoítos de *E. histolytica*. La cinética fue obtenida a partir del desenquistamiento de las estructuras semejantes a quistes (línea rosa), en comparación con el control (línea azul) de la cinética de crecimiento normal. La gráfica muestra la media y la DS de tres experimentos independientes de las células desenquistadas.

7.5 INDUCCIÓN DEL CICLO DE VIDA AXÉNICO DE *Entamoeba histolytica* *IN VITRO*

A partir de las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* obtenidas del ensayo 16 de la Tabla VI, se logró reproducir el ciclo de vida axénico de *Entamoeba histolytica in vitro*, a esta metodología se le denominó “Método TGC7” (Fig. 13). Empleando esta metodología, se realizaron por triplicado ensayos para inducir el ciclo de vida axénico de *E. histolytica in vitro*, los resultados obtenidos se muestran en las figuras 14a, 14b y 14c y en la Tabla X. En estos resultados se muestran y se describen los diferentes estadios que presenta *E. histolytica* durante los estadios principales de su ciclo de vida como son el trofozoíto, prequiste, quiste y metaquiste, cabe recalcar que en esta descripción a las estructuras semejantes a quistes obtenidas *in vitro*, las referimos como quistes de *E. histolytica*.

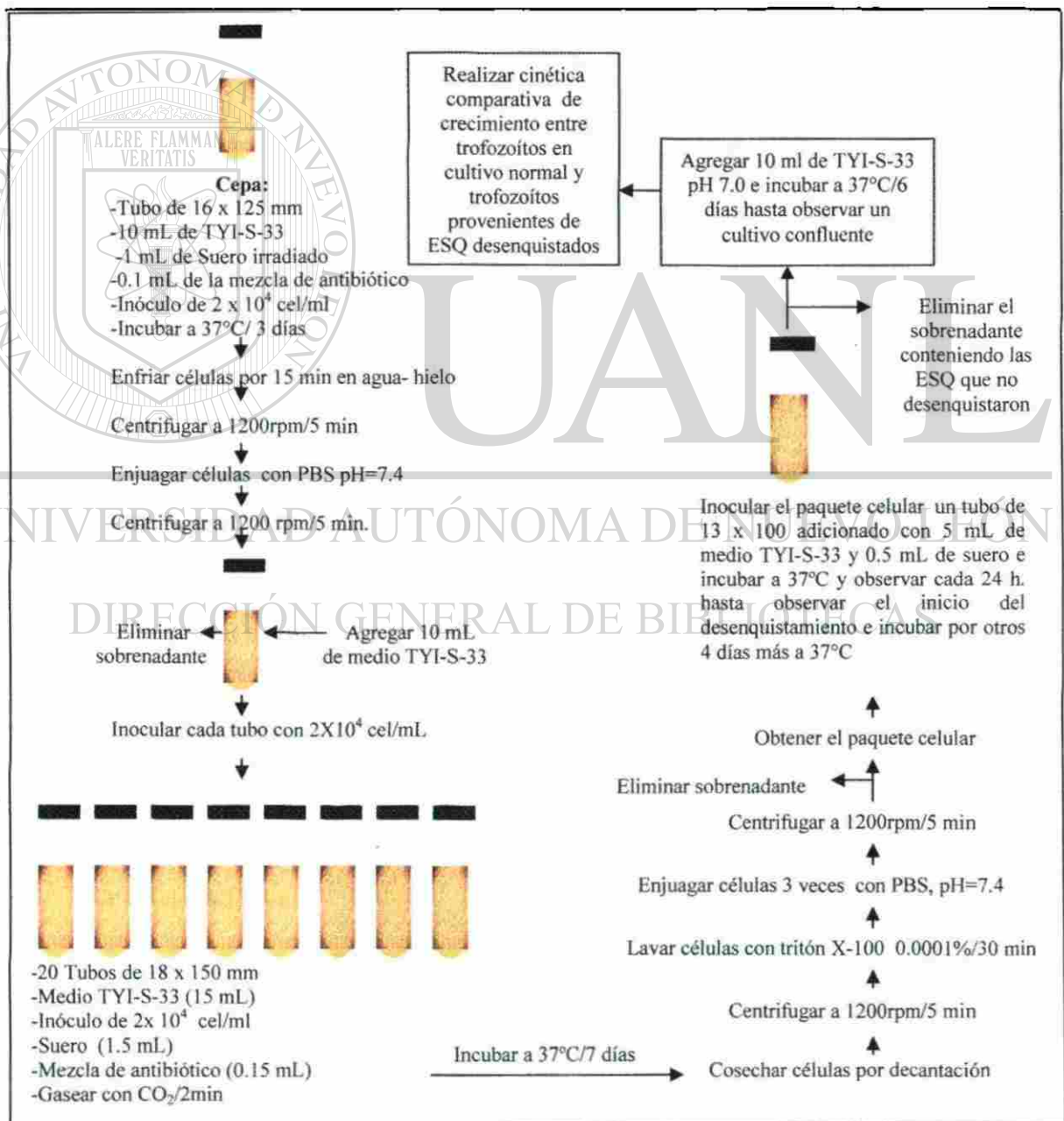


Figura 13. Método TGC7. Método desarrollado bajo condiciones axénicas para inducir el ciclo de vida de *Entamoeba histolytica in vitro*.

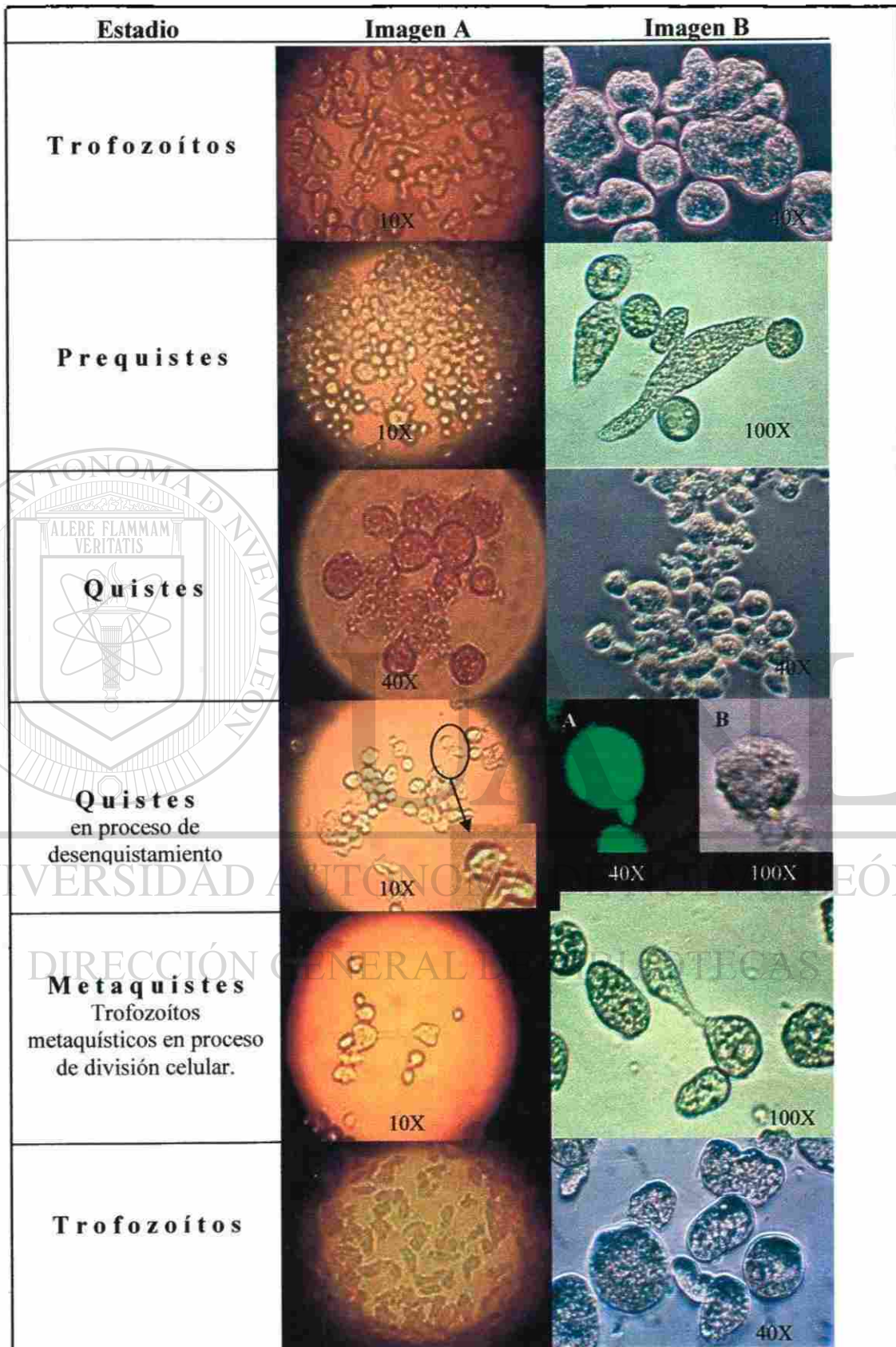


Figura 14a. Ciclo de vida axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*. En esta figura se muestran los principales estadios del ciclo de vida axénico de *E. histolytica in vitro*: trofozoíto, prequiste, quiste y metaquiste.

Tabla X

Descripción de los estadios del ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* obtenidos *in vitro*

| Estadio | Detalles de la imagen y equipo empleado | Imagen A | Imagen B |
|-------------------|---|--|---|
| Trofozoito | Descripción | Se observan trofozoitos en muy buen estado y de aspecto pleomórfico los cuales se encuentran adheridos a la base del tubo de vidrio. (10x) | Se observan trofozoitos en muy buen estado y de aspecto pleomórfico. Esta imagen se obtuvo a través de microscopio de contraste de fase (40x) |
| | Detalles de cultivo | Se incubaron por 3 días en TYI-S-33 completo | Se incubaron por 3 días en TYI-S-33 completo, se fijaron con glutaraldehído |
| | Fotodocumentación | Microscopio Invetido, Zeiss Cámara Sony Cyber Shot 3 Mp. | Microscopio de contraste de fase, Zeiss Fase pH-2, filtro azul. Canon EOS RebelG, Rollo Kodak, Asa 100. |
| Prequiste | Descripción | Se observa en el fondo de la base del tubo de vidrio, tanto trofozoitos prequisticos aún con su aspecto pleomórfico así como también se observan algunos prequistes de aspecto redondeado y refringente. (10X) | En este estadio conviven en el mismo tubo tanto trofozoitos prequisticos como prequistes de aspecto redondeado y refringente, en dos de ellos se observa la presencia de 2 núcleos característicos con su cariosoma central, entre estos prequistes se observa un trofozoito, entre ellos es evidente la diferencia de sus dimensiones. (40X) |
| | Detalles del metodo | Se aplicó a los trofozoitos el método de alta tension de CO ₂ y se incubaron por cuatro días. | Se aplicó a los trofozoitos el método TGC7, se incubaron por cuatro días y se fijó la muestra con glutaraldehído |
| | Fotodocumentación | Microscopio Invetido, Zeiss Cámara Sony Cyber Shot 3 Mp. | Microscopio de contraste de fase, Zeiss Fase pH-3, filtro azul. Canon EOS RebelG, Rollo Kodak, Asa 100. |
| Quiste | Descripción | Se observa un grupo de quistes. presentan aspecto esférico y bordes regulares, dos de ellos parecen estar unidos por la misma cubierta y los ocho se encuentran agrupados por una especie de malla. 100X. | Se observa un grupo de estructuras quísticas, cada una estas estructuras presenta su típica morfología esférica y refringentes al microscopio de luz (40X) |
| | Detalles del método | Se aplicó a los trofozoitos al método TGC7 y se incubaron por siete días, se retaron con detergente y se fijaron con glutaraldehído | |
| | Fotodocumentación | Microscopio Invetido, Zeiss Cámara Sony Cyber Shot 3 Mp. | Microscopio de Contraste de fase, Zeiss Fase pH-2, filtro azul. Canon EOS Rebel G, Rollo Kodak, Asa 100. |

NOTA: Las imágenes A y B son referidas de la figura 14a.

160693

Continuación de la Tabla X

| | | | |
|---|-----------------------------|--|---|
| <p>Quiste en proceso de desenquistamiento</p> | <p>Descripción</p> | <p>Se observan algunas estructuras quísticas de aspecto esférico y refringentes a la luz, en el círculo se resalta una estructura quística de la cual lentamente emerge unseudópodo por uno de sus extremos, posiblemente por el opérculo, también se observan algunos trofozoítos de aspecto típico, el inicio de este proceso inicia a los 12 días de incubación. En esta imagen es evidente que el desenquistamiento <i>in vitro</i> de <i>E. histolytica</i> es asincrónico. (10X)</p> | <p>A) Se observan una estructuras quística fluorescente, de aspecto esférico de la cual emerge unseudópodo por uno de sus extremos el cual también fluoresce, (40X)</p> <p>B) Se observan una estructuras quísticas de aspecto esférico de la cual emerge unseudópodo por uno de sus extremos, posiblemente por el opérculo, en la imagen se aprecia la diferencia entre la superficie de la cubierta del quiste y delseudópodo. (100X)</p> |
| | <p>Detalles del método</p> | <p>Se cosecharon las estructuras quísticas y se sembraron en medio completo TYI-S-33 por 12 días.</p> | <p>Se cosecharon las estructuras quísticas, se sembraron en medio completo TYI-S-33 por 12 días y se fijaron con glutaraldehído</p> |
| | <p>Fotodocumentación</p> | <p>Microscopio Invetido, Zeiss Cámara Sony Cyber Shot 3 Mp.</p> | <p>A) Microscopio de fluorescencia Cámara Sony Cyber Shot 3 Mp. B)Microscopio de contraste de fase, Zeiss, Campo obscuro, filtro azul. Canon EOS RebelG, Rollo Kodak, Asa 100.</p> |
| <p>Metaquiste Trofozoítos metaquísticos en proceso de división celular</p> | <p>Descripción</p> | <p>Se observa un trofozoito metaquístico en proceso de división celular por fisión binaria lo cual dará origen a dos trofozoitos independientes, también se observan algunas estructuras esféricas y refringentes a la luz, el proceso es asincrónico (10X).</p> | <p>Se observa un trofozoito metaquístico en proceso de división celular por fisión binaria, se observan dos núcleos al interior de uno de los extremos del trofozoito metaquístico. (100X)</p> |
| | <p>Detalle del método</p> | <p>Mismo proceso de desenquistamiento e incubadas por 13 días.</p> | <p>Mismo proceso de desenquistamiento, incubadas por 13 días y fijadas con glutaraldehído.</p> |
| | <p>Fotodocumentación</p> | <p>Microscopio Invetido, Zeiss Cámara Sony Cyber Shot 3 Mp.</p> | <p>Microscopio de contraste de fase, Zeiss Fase pH-3, filtro azul. Canon EOS RebelG, Rollo Kodak, Asa 100.</p> |
| <p>Trofozoito</p> | <p>Descripción</p> | <p>Se observan trofozoítos en muy buen estado y de aspecto pleomórfico los cuales se encuentran adheridos a la base del tubo de vidrio. (10X)</p> | <p>Se observan trofozoítos de morfología pleomórfica típica, de aspecto normal., esta imagen se obtuvo por microscopía de contraste de fase. (40X)</p> |
| | <p>Detalles del cultivo</p> | <p>Se eliminaron por decantación las estructuras quísticas que no desenquistaron, a los trofozoítos metaquísticos se les agregó medio de cultivo TYI-S-33 completo y se incubaron por otros 6 días para obtener un cultivo confluyente.</p> | <p>Los trofozoítos que desenquistaron se incubaron por 3 días en TYI-S-33 completo y se fijaron con glutaraldehído.</p> |
| | <p>Fotodocumentación</p> | <p>Microscopio Invetido, Zeiss Cámara Sony Cyber Shot 3 Mp.</p> | <p>Microscopio de contraste de fase, Zeiss Fase pH-2, filtro azul. Canon EOS RebelG, Rollo Kodak, Asa 100.</p> |

En la figura 14b se observa una comparativa de los estadios del ciclo de vida de *E. histolytica*, en A se observan los estadios desarrollados bajo condiciones axénicas *in vitro* empleando el método TGC7 y en B se observan los estadios del ciclo de vida *in vitro* de *E. histolytica* reportados por el Control Diseases Center (www.cdc.com).

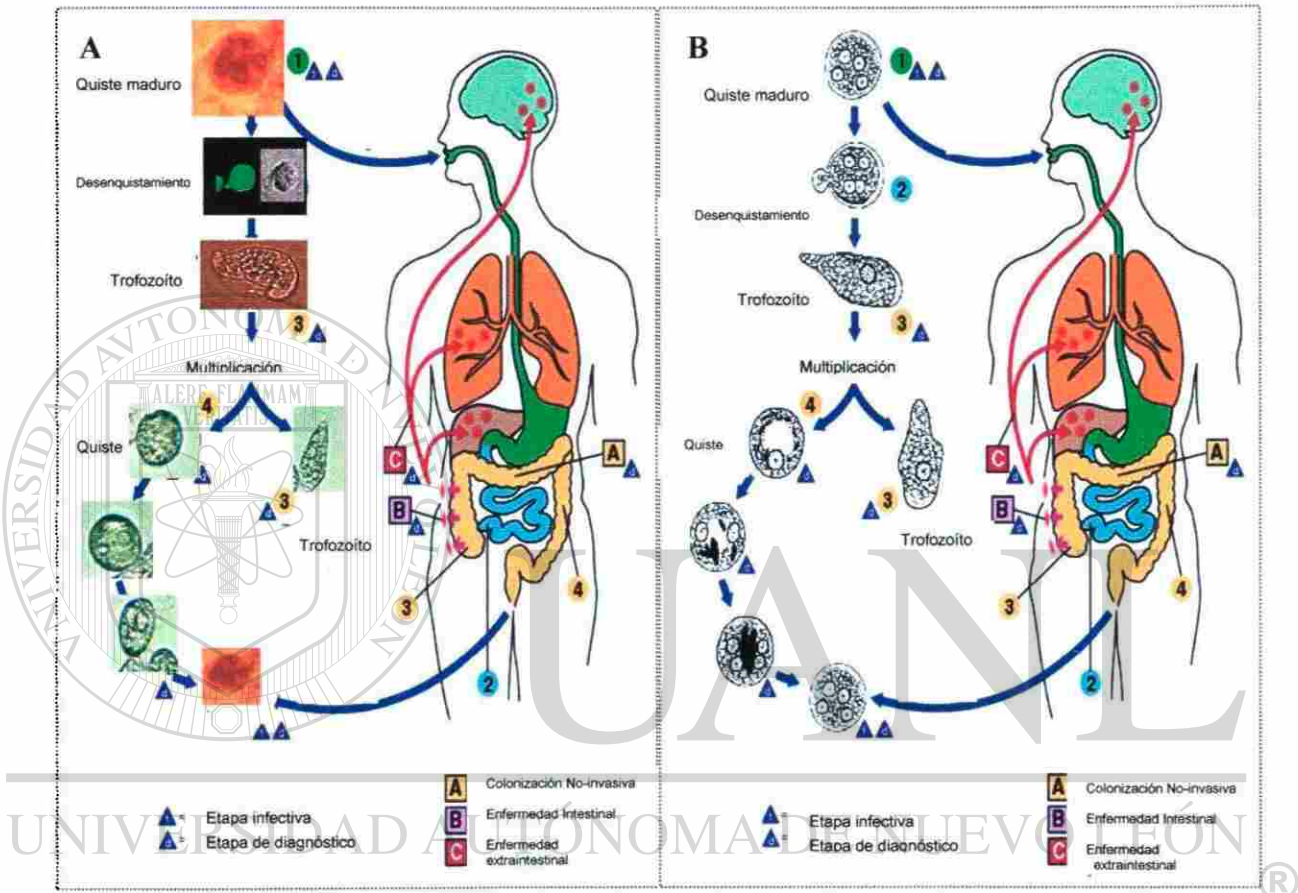


Figura 14b. Estadios del ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. A) estadios desarrollados bajo condiciones axénicas *in vitro*, B) estadios *in vivo* del ciclo de vida de *E. histolytica* reportado por la CDC (Control Diseases Center).

Bajo la metodología aquí empleada, *Entamoeba histolytica* tarda en promedio 23 días en reproducir su ciclo de vida axénico *in vitro* (Fig. 14c), por otra parte cabe mencionar que el proceso es asincrónico y solamente una fracción del total de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* cumplen esta descripción y el resto no desenquista.

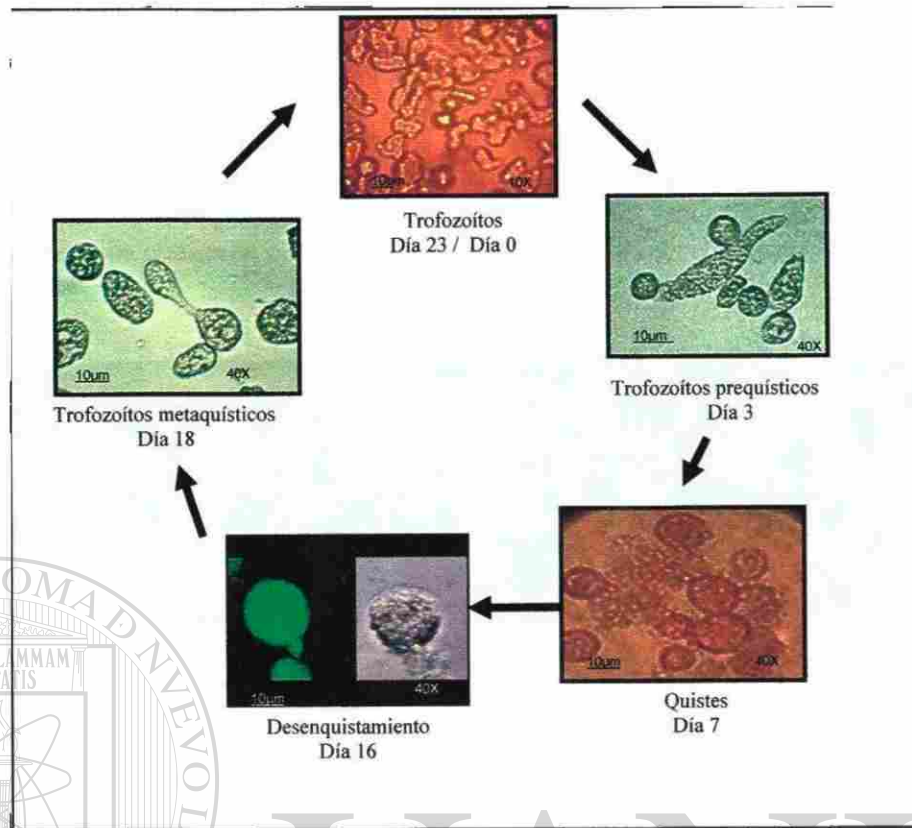


Figura 14c. Ciclo de vida axénico de *E. histolytica* in vitro. Empleando el método TGC7 desarrollamos el ciclo de vida de *E. histolytica*, bajo condiciones axénicas in vitro a *E. histolytica* le toma en promedio un total de 23 días para completar su ciclo de vida y formar nuevamente un cultivo confluyente

7.6 MORFOLOGÍA DE LOS TROFOZOITOS, QUISTES Y ESTRUCTURAS SEMEJANTES A QUISTES DE *E. histolytica*

7.6.1 Tinciones

Las diversas tinciones especiales realizadas nos permiten evidenciar algunas características morfológicas y de composición de las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* y compararlas con trofozoitos y quistes de este protozoo.

7.6.1.1 Fluorescencia

Las estructuras quísticas de *Entamoeba histolytica* obtenidas de acuerdo al método TGC7, se tiñeron con calcoflúor M2r para observar fluorescencia de la pared quística ya que este colorante tiene afinidad por quitina, la cual es un polímero con enlace de N-acetil-glucosamina que se encuentra como constituyente principal de la pared quística. Como control negativo se tiñeron trofozoitos provenientes de cultivos a la mitad de la fase log de crecimiento (Fig. 15-A), como testigo empleamos quistes de *Entamoeba invadens* obtenidos

in vitro (Fig.15-B), como control positivo se tiñeron quistes aislados a partir de heces diarreicas de pacientes con amibiasis (Fig.15-C), en los cuales se observa la intensa fluorescencia característica de estas estructuras; en las formas semejantes a quistes que se obtuvieron *in vitro* (Fig.11-D) el patrón de fluorescencia es semejante al control positivo y al testigo, no así en los trofozoítos en los cuales se observa una débil fluorescencia en algunos de ellos.

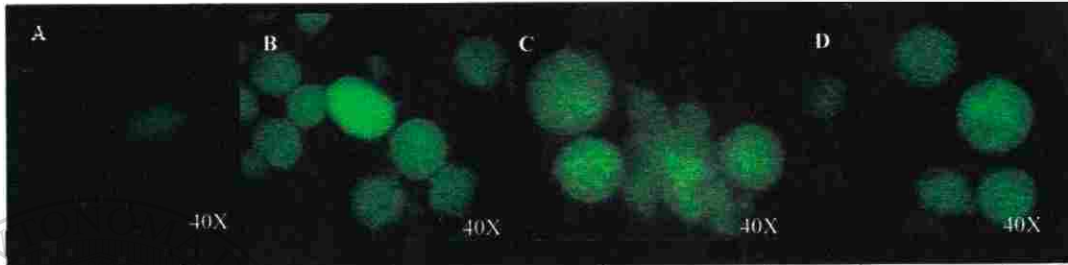


Figura 15. Comparación del patrón de tinción con calcoflúor M2r: A) control negativo, trofozoítos de *E. histolytica*, B) testigo, quistes de *E. invadens*, C) control positivo, quiste de paciente y C) estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* obtenida *in vitro*.

7.6.1.2 Tinción Tricrómica

Los resultados de la tinción con el colorante tricrómico de Gomori se muestran en la figura 16. En la imagen A de esta figura se aprecian trofozoítos de aproximadamente 40 μ m de diámetro, observados a microscopio de luz y fotodocumentadas con cámara automática y rollo kodak asa 100, se aprecia de aspecto pleomórfico, delimitados por una membrana celular (mc), en su interior se observa un núcleo (n) el cual se observa teñido intensamente y el citoplasma (c) se observa de una tonalidad verde-violácea característica de esta tinción, además es posible apreciar dos pseudópodos (s) de aspecto hialino; en la imagen B correspondiente a un quiste de aproximadamente 20 μ m, obtenido de muestra de paciente, observado a microscopio de luz y fotodocumentadas con cámara automática y rollo kodak asa 100, se aprecia una estructura esférica y en su interior se observan dos núcleos (n) con su típico cariosoma central (cc) teñidos intensamente y el citoplasma (c) se observa de una tonalidad violácea, en la imagen C correspondiente a una estructura quística obtenida *in vitro* y fotodocumentada a través de cámara digital SONY cyber-shot se observan una estructura esférica de aproximadamente 20 μ m claramente delimitada por una pared celular (pc), en su interior se observan múltiples núcleos (n) teñidos intensamente y el citoplasma se aprecia de una tonalidad verde-violácea, siendo todas estas características de un quiste maduro de *Entamoeba histolytica* como se aprecia en la imagen B de la misma figura 16.

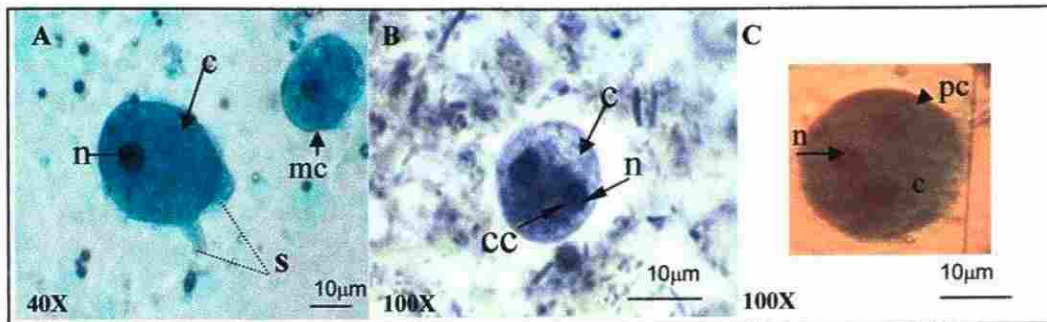


Figura 16. Comparación del patrón de la tinción tricrómica. Tinción tricrómica realizada en: A) en trofozoítos de *E. histolytica* cultivada *in vitro*, el cual está delimitado por la membrana celular (mc), al interior del citoplasma (c) se observa un núcleo(n), además se observan dos pequeños pseudópodos (s). B) quiste de *E. histolytica* obtenido de paciente que presenta al interior del citoplasma (c) dos núcleos (n) con el cariosoma central (cc). C) estructura quística obtenida *in vitro* en la que al igual al quiste de paciente, también se aprecian multinucleación a diferencia de la imagen A, en la cual se aprecia un sólo núcleo y de aspecto pleomórfico.

7.6.1.3 Tinción con yodo-lugol

Las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* obtenidas *in vitro* fueron teñidas con la técnica tradicional de yodo-lugol, ya que dicho colorante tiene afinidad por los polímeros de N-acetil-glucosamina y además tiñe al núcleo, permitiendo una fácil y rápida identificación de estos, como se observa en la Fig. 17, en A se observa un quiste de *E. histolytica* obtenido de un paciente con amibiasis (según Center Diseases Control) y en B el patrón de tinción de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica* obtenida *in vitro* bajo condiciones axénicas, esta imagen fue fotodocumentada a través de una cámara SONY cyber-shot 3.0, el patrón de tinción es semejante, permitiendo observar multinucleación en ambas imágenes.

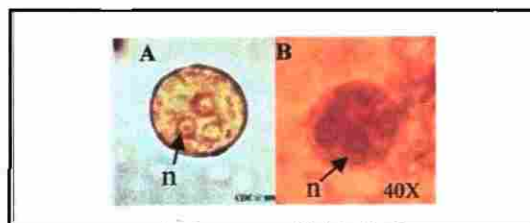


Figura 17. Comparación del patrón de tinción con yodo-lugol. A) quiste de *E. histolytica* obtenido de un paciente con amibiasis y B) estructura semejante a quiste de *E. histolytica* obtenida *in vitro* en el cual se observa multinucleación (aumento original 40X).

7.7 ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y TOPOGRÁFICO DE LAS ESTRUCTURAS SEMEJANTES A QUISTES DE *Entamoeba histolytica*

7.7.1 Análisis morfológico de las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Se realizaron cortes semifinos tanto de trofozoítos como de estructuras semejantes a quistes obtenidos mediante el método TGC7, en la figura 18 se observa un corte semifino de un grupo de trofozoítos cultivados en el medio TYI-S-33 bajo condiciones normales, en esta imagen se observa que los trofozoítos presentan el aspecto típico pleomórfico. En esta imagen es posible observar que están delimitadas por la membrana celular (mc), en varias de ellas la presencia de un núcleo (n) el cual se tiñe intensamente de azul-violáceo, y al interior se observan vacuolas distribuidas uniformemente en el citoplasma.

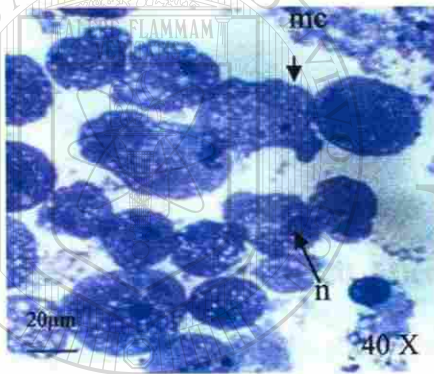


Figura 18. Corte semifino de un trofozoito de *E. histolytica*. Imagen correspondiente al corte semifino de un grupo de trofozoítos cultivados en el medio TYI-S-33, bajo condiciones normales, los cuales presentan el típico aspecto pleomórfico, están delimitados por la membrana celular (mc) y presentan un sólo núcleo (n) teñido intensamente. (aumento original 40X)

En la figura 19 observamos la imagen correspondiente a una estructura semejante a quiste de *E. histolytica* obtenida de acuerdo al bioensayo 16 (Tabla VI), en esta imagen se observa que esta estructura está delimitada por lo que puede corresponder a una delgada pared celular (pc), al interior se observa la presencia de tres núcleos (n) con la cromatina adosada en la periferia interna de la membrana nuclear, en dos de estos núcleos se observa claramente un cariosoma central, dicha descripción concuerda con la reportada para quistes maduros de *E. histolytica*.

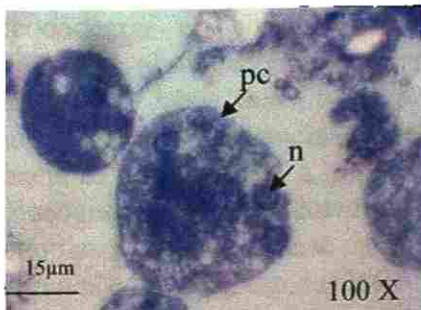


Figura 19. Corte semifino de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica*. Imagen correspondiente al corte semifino de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica* teñida con azul de toluidina, la cual se observa delimitada por la pared celular (pc), también se observan 4 núcleos (n) con la cromatina condensada en la periferia y un cariosoma central, dicha descripción corresponde a los núcleos de un quiste maduro de *E. histolytica*. (aumento original 100 X)

Por otra parte se hicieron cortes finos para microscopía electrónica de transmisión. En la figura 20 se observa la imagen de un trofozoíto de *E. histolytica* cultivado bajo condiciones normales e incubados por 3 días, el cual está delimitado por la membrana celular (mc) y presenta su aspecto pleomórfico típico, el núcleo (n) presenta la cromatina condensada en la periferia de la cara interna de la membrana nuclear, en el citoplasma se encuentran dispersas de forma uniforme vacuolas (v), también es evidente la presencia de gránulos posiblemente de glucógeno.

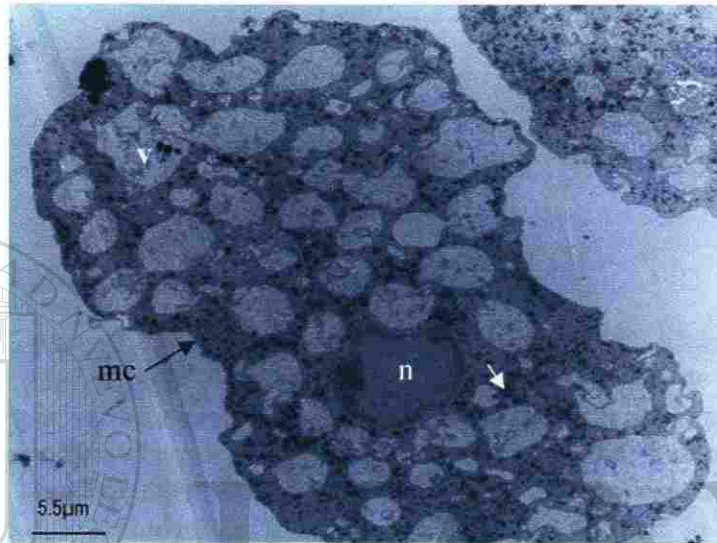


Figura 20. Micrografía electrónica de un trofozoíto de *E. histolytica*. Trofozoíto cultivado por 3 días en TYI-S-33 bajo condiciones normales. El trofozoíto muestra estar delimitado por la membrana celular (mc), nótese su aspecto pleomórfico y el núcleo (n) con la cromatina condensada en la periferia de la cara interna de la membrana nuclear, en esta imagen es evidente la gran cantidad de vacuolas (v) y de gránulos de glucógeno distribuidos abundantemente en el citoplasma (flecha blanca). 2000X

En la micrografía electrónica de la figura 21 se observa la imagen correspondiente a un trofozoíto de *E. histolytica* cultivado por 3 días en TYI-S-33 bajo condiciones de alta tensión de CO₂, en el cual se observa la tendencia a redondearse en comparación con los trofozoítos cultivados bajo condiciones normales, el núcleo (n) no presenta su aspecto esférico y la cromatina se encuentra disgregada hacia uno de los extremos del núcleo, lo cual podría representar una inminente división nuclear, por otra parte las vacuolas se encuentran distribuidas hacia el polo opuesto a la ubicación del núcleo en el citoplasma y los gránulos de glucógeno (gg) se encuentran distribuidos principalmente en la parte central del citoplasma, por otra parte en la sección ampliada de esta misma imagen se observan algunos cuerpos alargados los cuales corresponden e hélices de ribonucleoproteínas.

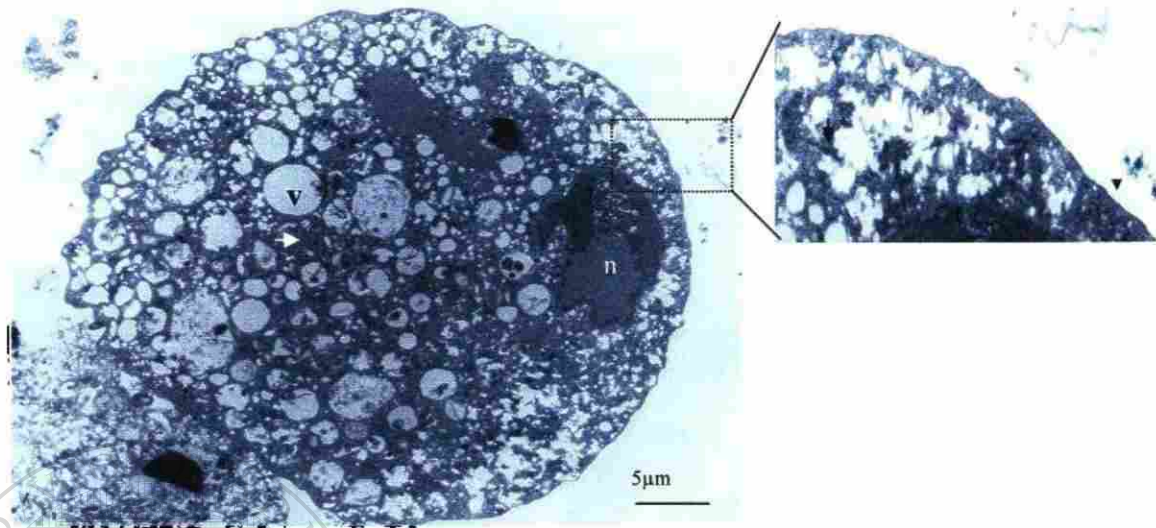


Figura 21. Micrografía electrónica de un trofozoíto de *E. histolytica*. Trofozoíto cultivado por 3 días en TYI-S-33 bajo condiciones de alta tensión de CO₂, el trofozoíto presenta tendencia a redondearse, el núcleo (n) no presenta su aspecto esférico y la cromatina se encuentra disgregada, lo cual podría corresponder a un estado de división nuclear, nótese la distribución de las vacuolas hacia el extremo opuesto del núcleo y la distribución de los gránulos de glucógeno (flecha blanca) en la parte central del citoplasma. 6,200X. En la imagen ampliada de la sección señalada en el recuadro derecho se observan escasas barras posiblemente de hélices de ribonucleoproteínas (flecha negra). Aumento original 12.400X

En la micrografía de la figura 22 se observa la fracción de un trofozoíto cultivado bajo condiciones de alta tensión de CO₂, en esta imagen el núcleo (n) se observa ovalado y con la cromatina disgregada, en el citoplasma se observan estructuras alargadas que corresponden a hélices de ribonucleoproteínas (cabeza de flecha).

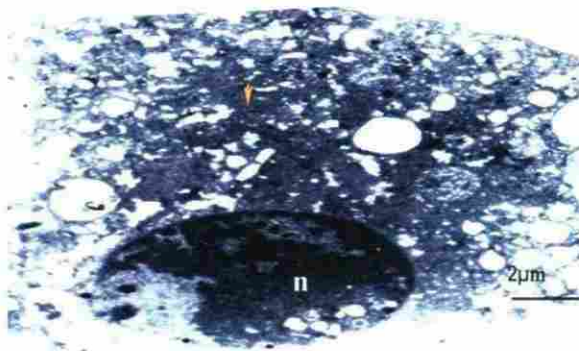


Figura 22. Micrografía electrónica de una porción de un trofozoíto de *E. histolytica*. Trofozoíto cultivado por 3 días en TYI-S-33 bajo condiciones de alta tensión de CO₂. En el núcleo (n) la cromatina se encuentra disgregada y en el citoplasma se observan estructuras alargadas características de hélices de ribonucleoproteínas (cabeza de flecha) 12,400 X.

En la micrografía de la figura 23 se observa la fracción de dos células de *E. histolytica* cultivada por 4 días en TYI-S-33 bajo condiciones de alta tensión de CO₂. Las células se encuentran delimitadas por su membrana celular (mc) correspondiente la cual se observa de borde regular, en una de las células el núcleo (n) se observa alargado, la cromatina (c) se encuentra distribuida en los polos del núcleo, también se observan escasas vacuolas vacías, en otras se observan invaginaciones y en la mayoría se observan cuerpos intravacuolares (civ).

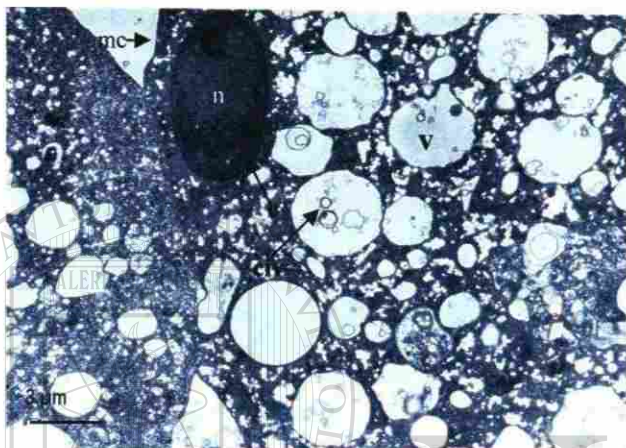


Figura 23. Micrografía electrónica de una sección de dos células de *E. histolytica*. Células cultivadas por 4 días en TYI-S-33 bajo condiciones de alta tensión de CO₂. Las células se encuentra delimitada por la membrana celular (mc) la cual se observa de borde regular, en una de ellas el núcleo (n) se observa alargado, la cromatina (c) se encuentra distribuida en los polos del núcleo. En algunas vacuolas se observan invaginaciones y en otras se observan cuerpos intravacuolares (civ). 5000X

En la micrografía de la figura 24 se observa una célula de *E. histolytica* cultivada en el medio TYI-S-33 por 7 días en presencia de alta tensión de CO₂, en A se observa una estructura esférica semejante a un quiste la cual presenta un núcleo (n) con la cromatina (c) adherida a la periferia de la cara interna de la membrana nuclear, en B se observa una magnificación de la pared celular y en C se observa una sección de la estructura quística en la cual destaca la presencia de gran cantidad de vacuolas (v), algunas de ellas presentan inclusiones intravacuolares (iiv) estas inclusiones presentan material granular semejante al que se encuentra presente en el citoplasma, este material granular también se observa adherido a la membrana de las vesículas y también se encuentran presentes en las vesículas intravacuolares (vi), la pared celular es delgada y de bordes regulares.

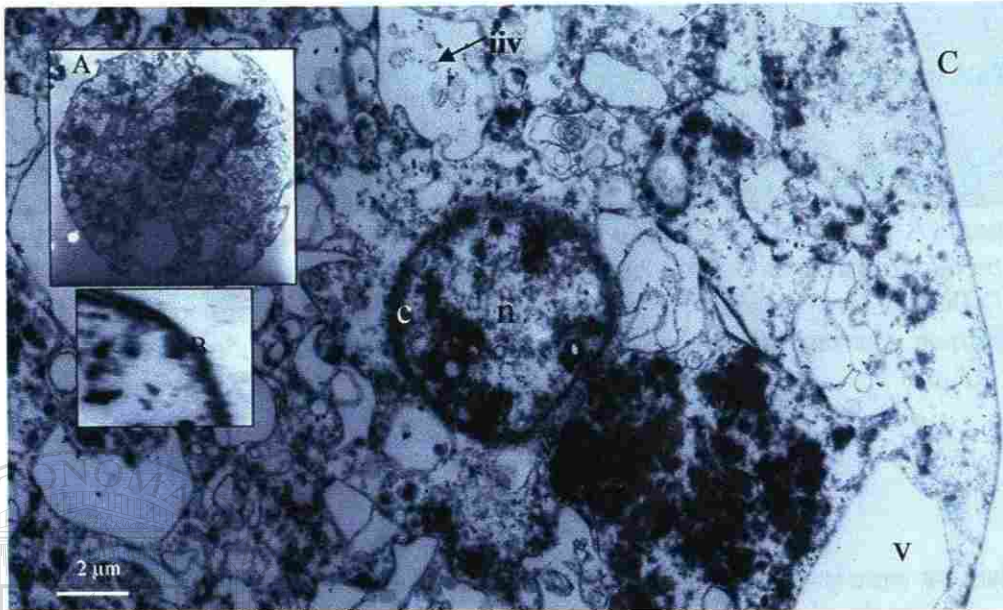


Figura 24. Micrografías electrónicas de una célula de *E. histolytica*. Célula cultivada en el medio TYI-S-33 a 37°C por 7 días en presencia de alta tensión de CO₂. En A se observa una estructura redondeada semejante a un quiste, presenta un núcleo (n) con la cromatina (c) adherida a la periferia de la cara interna de la membrana nuclear (aumento original 6,200X), en B se observa una magnificación de la pared celular y en C se observa una sección de la estructura quística en la cual destaca la presencia de gran cantidad de vacuolas (v), algunas de ellas presentan inclusiones intravacuolares(iiv), el material granular también está presente en el citoplasma, la pared celular se observa de bordes regulares. 12,400X

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

7.7.2 Análisis topográfico de las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* mediante Microscopía Electrónica de Barrido

Se llevó a cabo la preparación de muestras de trofozoítos, quistes obtenidos de pacientes y de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* obtenidas mediante el método TGC7 y se observaron al microscopio electrónico de barrido marca DSM 950. En la figura 25 se muestran diversos aspectos de los trofozoítos de *E. histolytica*, en A se observa el aspecto panorámico de un cultivo normal. En B se observa un trofozoíto de *E. histolytica* de aspecto pleomórfico el cual mide aproximadamente 30μm de largo, la topografía muestra la superficie celular con múltiples pliegues y un pequeño pseudópodo (s). En la imagen C se observa a mayor aumento la superficie de la membrana celular (mc) de un trofozoíto.

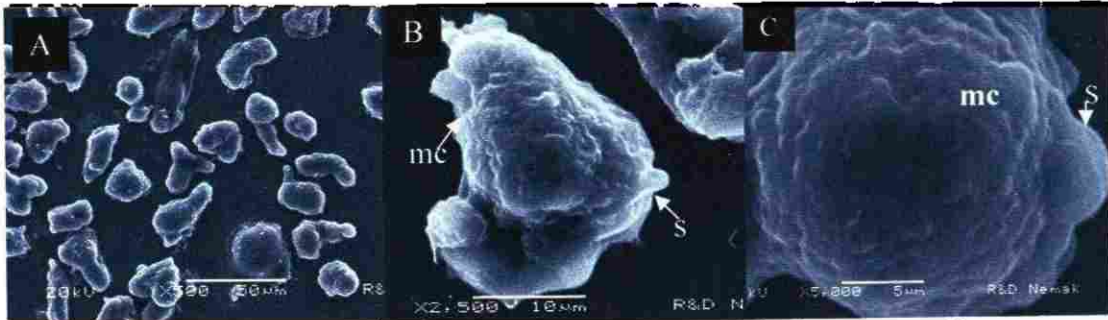


Figura 25. Aspecto de trofozoítos de *E. histolytica* observados al MEB. A) imagen panorámica de un grupo de trofozoítos (500X), B) aspecto típico de un trofozoíto en el cual se observan pequeños pseudópodos (s) y membrana celular (mc) (2,500X) y C) detalles de la membrana celular (mc) de un trofozoíto que presenta pequeños pseudópodos (s), (5,000X).

Por otra parte se llevó a cabo la preparación de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* obtenidos *in vitro* y se observaron al microscopio electrónico de barrido DSM 950; en la figura 26 se observa un agregado de estas estructuras con un aspecto esférico, algunas unidas entre sí. En la figura 27 se observa la unión celular entre dos estructuras semejantes a quistes las cuales están fusionadas por la prolongación de sus paredes celulares. En la figura 28 se observa una hendidura superficial en una estructura quística, la cual pudiese corresponder al sitio de salida del trofozoíto durante el desenquistamiento, en el recuadro se muestran las dimensiones de una estructura quística de *E. histolytica*, dicha estructura mide 10.6µm. En la figura 29 se observa la topografía de la superficie de una estructura semejante a un quiste, la cual se aprecia rugosa y formada por una red o malla de fibrillas. Todas las anteriores características son similares a las reportadas para quistes obtenidos a partir de heces formadas de pacientes diagnosticados con amibiasis (Fig.31). Estas características topográficas también se presentan en la pared de quistes de *Entamoeba invadens* (Fig. 30).

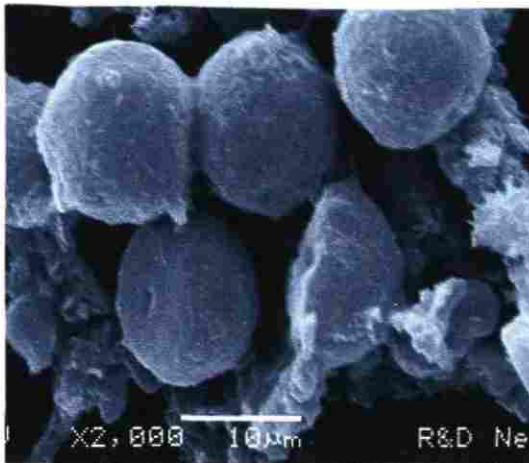


Figura 26. Agregado de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. Las ESQ muestran una topografía ligeramente rugosa.

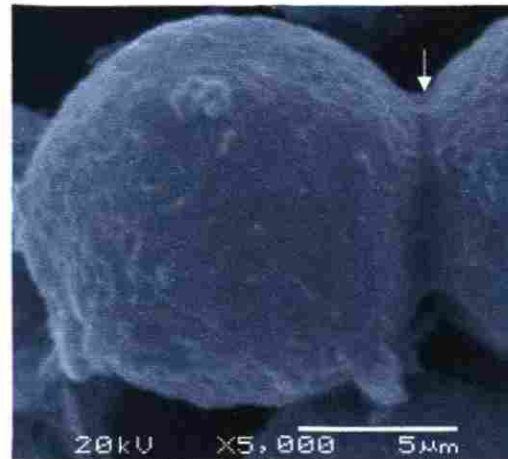


Figura 27. Estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. ESQ unidas a través de una pared que se prolonga de una estructura quística a otra (flecha).

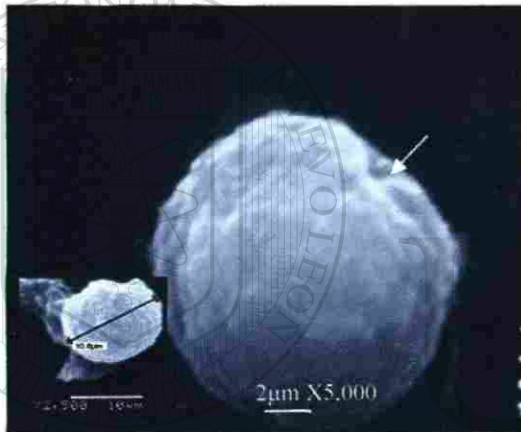


Figura 28. Estructura semejante a quiste de *E. histolytica*. En la superficie de la ESQ se aprecia una hendidura (flecha). En el recuadro se muestra las dimensiones de una estructura quística.

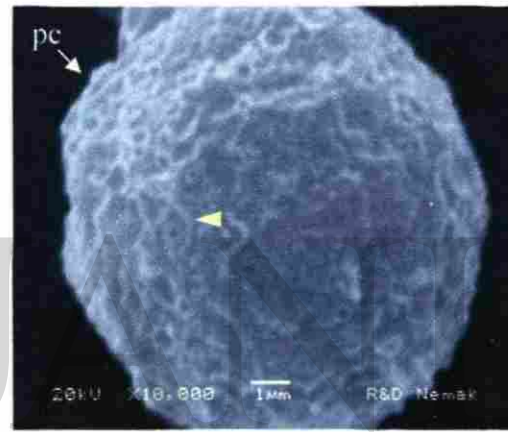


Figura 29. Topografía de la pared celular (pc) de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica*. La pared celular se aprecia de bordes rugosos e irregulares formados por una red de fibrillas (cabeza de flecha).

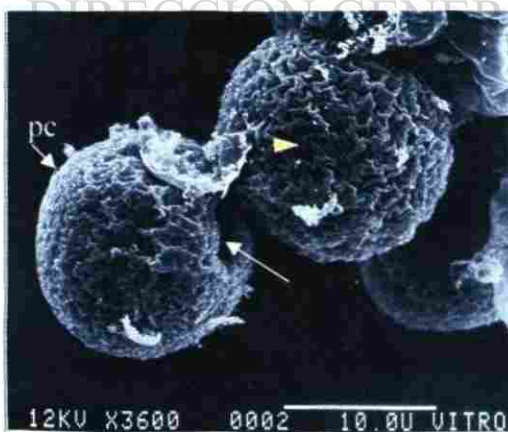


Figura 30. Quistes de *Entamoeba invadens*. La pared celular (pc) se observa formada por fibrillas (cabeza de flecha), también se observa una hendidura (flecha). (Imagen tomada de Morales, 1989)

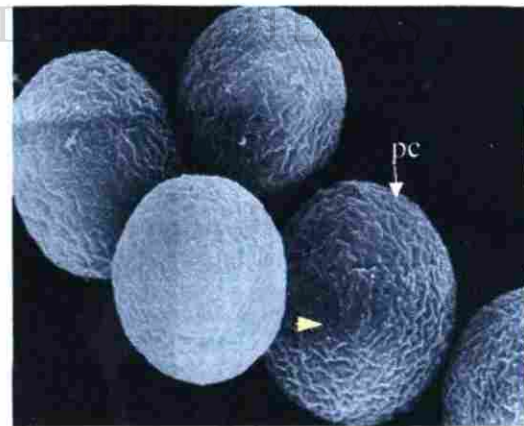


Figura 31. Topografía de un agregado de quistes de *E. histolytica*. La pared celular (pc) se observa de bordes rugosos e irregulares formados por una red de fibrillas (cabeza de flecha). (Imagen tomada de Martínez, 1987)

7.7.2.1 Análisis semicuantitativo

La composición porcentual de las estructuras quísticas de acuerdo al análisis semicuantitativo proporcionado por el MEB, indica que predominan el carbono (69.4%) y el oxígeno (26.26%), el resto son sales, en este análisis no se aprecia el nitrógeno posiblemente por ser un elemento que se encuentra en muy baja proporción como constituyente de la quitina (Fig. 4 y Fig. 32).

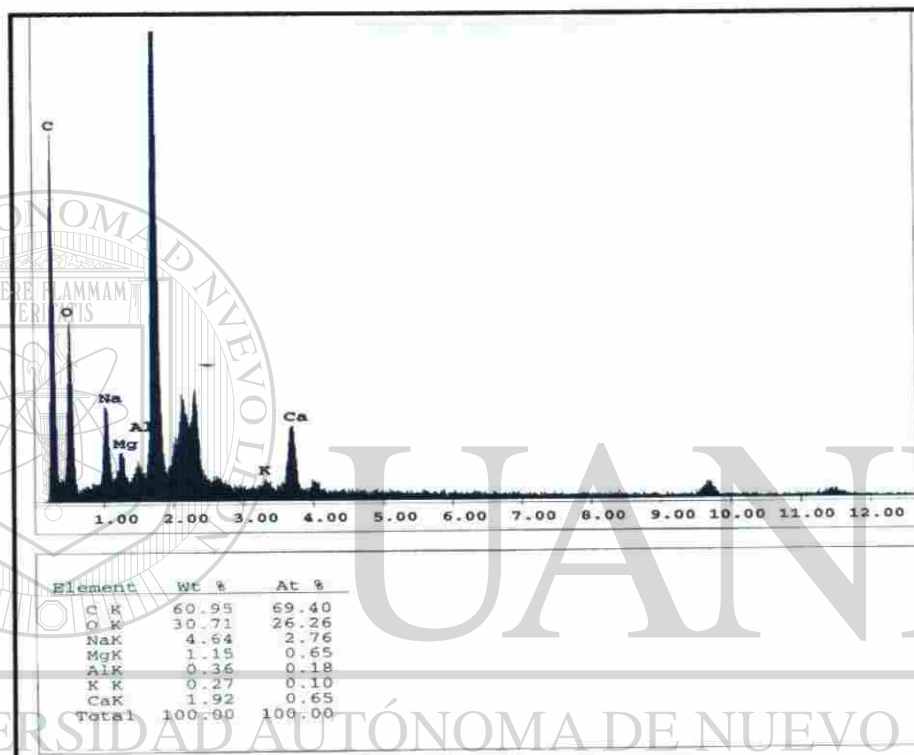


Figura 32. Análisis semicuantitativo de la pared celular de una ESQ. A través del MEB se realizó el análisis semicuantitativo de la pared celular de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica* resistente al detergente tritón X-100.

7.7.3 Análisis topográfico de las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* a través de Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)

Una fracción de la pastilla que se procesó para MEB, fue procesada para realizar observaciones empleando microscopía de fuerza atómica de contacto intermitente o tapping y de No-contacto

7.7.3.1 MFA de contacto intermitente o tapping

En la figura 33 se observa la imagen proporcionada por MFA de Contacto Intermitente o tapping, el análisis bidimensional indica que la estructura quística presenta un diámetro de 20 μm por 5 μm de alto cabe recalcar que la altura real de acuerdo a los datos sería de 10 μm , lo que nos proporciona una imagen ovoide, sin embargo esta altura posiblemente se aprecia disminuida debido a que la muestra se encuentra algo embebida en el material de preparación para su observación, en esta imagen se aprecia una tonalidad que va desde el amarillo muy claro (representa la zona más alta de la muestra) hasta la tonalidad negra u oscura lo cual es indicativo de la zona más profunda que detecta la aguja lector, esta estructura quística de *E. histolytica* presenta una pared rugosa con una serie de relieves en la superficie, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por MEB.

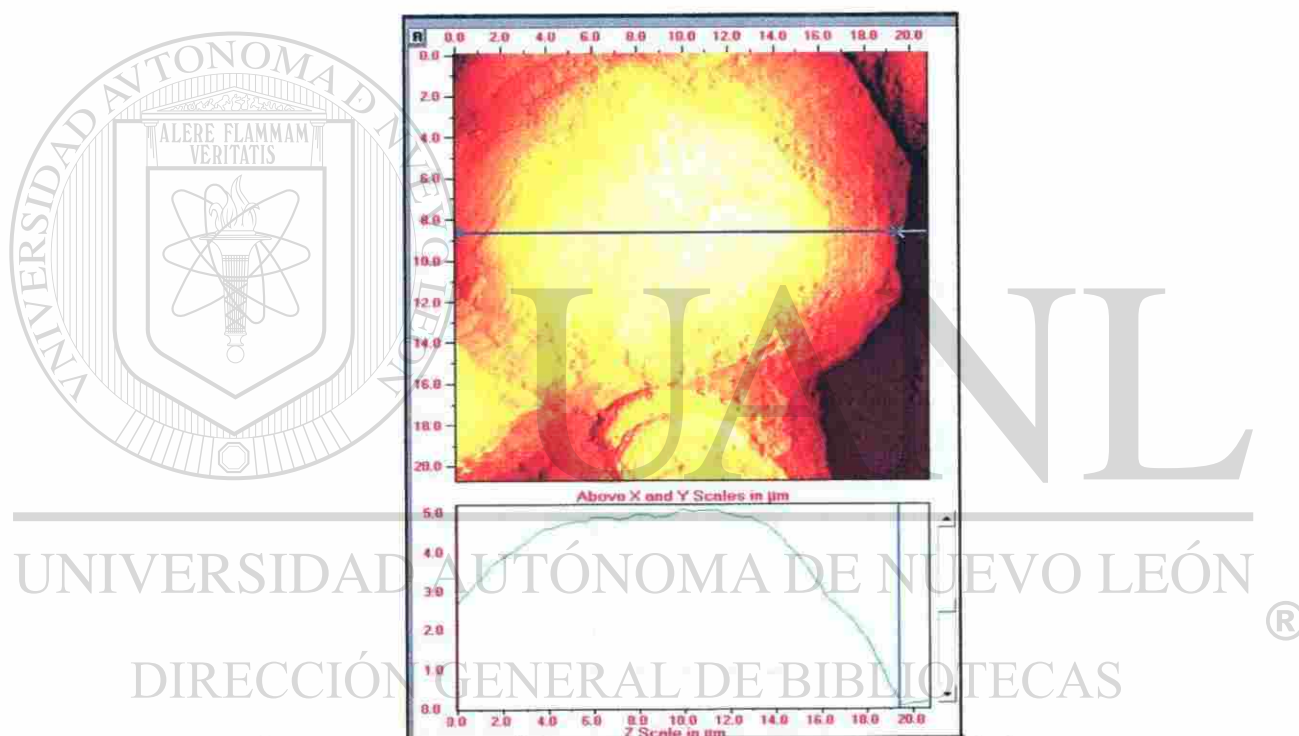


Figura 33. Análisis bidimensional de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica*. El análisis bidimensional de una ESQ obtenida *in vitro* fue observada a través de MFA de Contacto intermitente o tapping, la topografía muestra una pared rugosa con una serie de relieves a diferente profundidad.

En la figura 34 se observa la imagen proporcionada por el MFA de contacto intermitente o tapping, de una región de la pared celular de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica* obtenida *in vitro*, en esta imagen se observa que la superficie de la pared celular no es lisa, más bien se observan múltiples rugosidades o desniveles de la pared celular (dato indicado por la tonalidad de la superficie: amarillo indica la región más alta y la región oscura indica la región más profunda), esta imagen está dada por una profundidad de lectura de hasta 1400 nm.

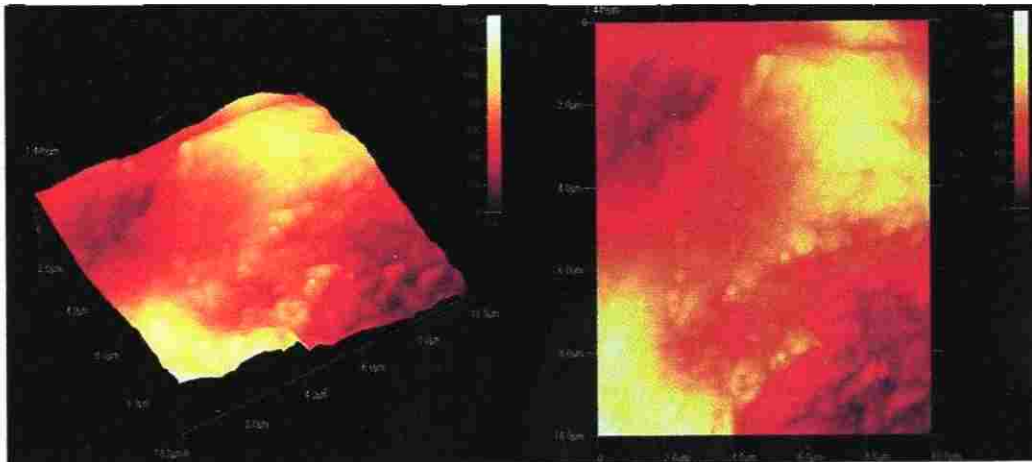


Figura 34. Análisis topográfico de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica*. Una sección de la superficie de una estructura quística de *E. histolytica* fue observada al MFA de Contacto intermitente o tapping, el análisis topográfico muestra la pared celular rugosa.

7.7.3.2 MFA de No-contacto

En la figura 35 se observa la imagen proporcionada por MFA de No contacto, de una región de la pared celular de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica*, en la cual se observa que la pared está formada por una red de fibrillas en las cuales se observan cuatro crestas y tres valles y en conjunto forman redes más grandes, que en conjunto miden aproximadamente $0.1 \mu\text{m}$ y cuya altura alcanza un máxima de 800 \AA y aproximadamente el 50% de estas estructuras alcanzan una altura máxima de 500 \AA . La imagen al microscopio de fuerza atómica es la primera que se reporta para una estructura quística de *Entamoeba histolytica* obtenida *in vitro* bajo condiciones axénicas.

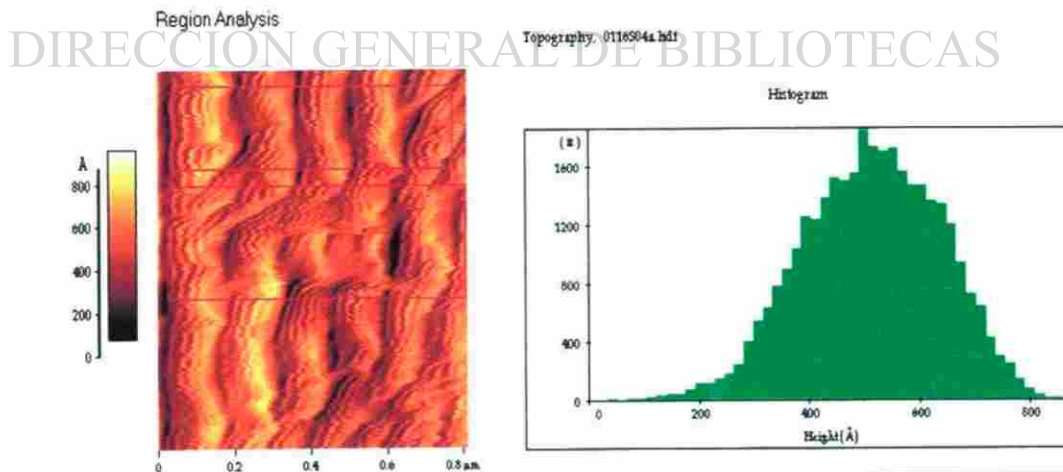


Figura 35. Análisis topográfico de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica* a través de microscopía de fuerza atómica de No-contacto. Determinación de altura de “micropliegues” en la superficie de la pared celular de una estructura quística de *E. histolytica* obtenida *in vitro* observada a través de microscopía de fuerza atómica de No-contacto, en la cual se observa que la pared está formada por una red de fibrillas o crestas.

7.8 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO COMPARATIVO SDS-PAGE DE LOS COMPONENTES PROTEICOS DE TROFOZOÍTOS Y ESTRUCTURAS SEMEJANTES A QUISTES DE *Entamoeba histolytica*

El análisis electroforético en geles de poliacrilamida de las proteínas se basa en la separación de éstas de acuerdo a su peso molecular, en la figura 36 observa que las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* presentan mayor número de bandas en relación con el patrón de corrimiento de la muestra de trofozoítos de *E. histolytica*, también se observa la presencia muy marcada de proteínas de peso molecular de aproximadamente 50, 66, 116 y 120 kDa, las cuales no se observan en trofozoítos; si bien los trofozoítos presentan bandas de peso molecular muy marcadas principalmente la banda de 35 y la banda de 95 kDa se observa menos intensa, en ambas muestras se observa una serie de bandas de peso molecular semejante entre 43y 66 kDa, siendo más intensas en las estructuras semejantes a quistes. Para este experimento los trofozoítos fueron cultivados bajo condiciones normales y las estructuras semejantes a quistes fueron obtenidas empleando el método TGC7, cabe recalcar que estos resultados se obtuvieron de un experimento en el cual partimos del mismo número de células.

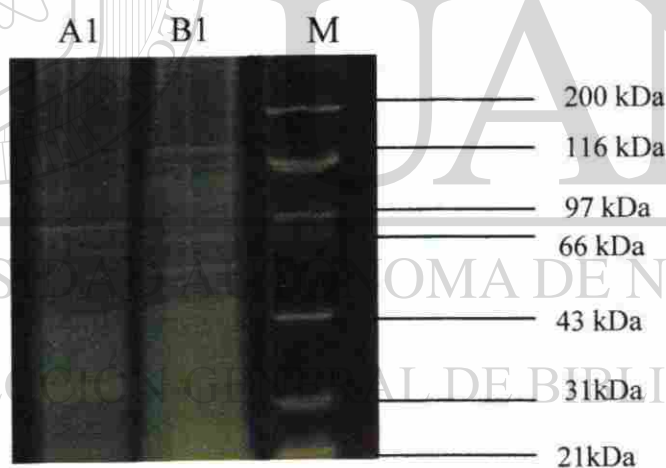


Figura 36. Patrón electroforético de proteínas totales de *E. histolytica*. A1) trofozoítos de *E. histolytica* cosechados a 72 h de incubación a 37°C, B1) estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* M) marcador de proteínas observados en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

En el patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. histolytica* evidencia dos bandas muy marcadas de aproximadamente 90kDa y de 35 kDa, en el patrón electroforético de las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* se tres bandas muy marcadas de aproximadamente 50 kDa, 60 kDa y 120 kDa. A la fecha no existen referencias acerca del patrón electroforético de quistes de *Entamoeba histolytica*.

7.9 CUANTIFICACIÓN DEL RNA TOTAL EN TROFOZOITOS Y ESTRUCTURAS SEMEJANTES A QUISTES DE *E. histolytica*

En micrografías electrónicas de transmisión obtenidas de estructuras semejantes a quistes de *Entamoeba histolytica*, se encontraron muy escasas hélices de ribonucleoproteínas o de cuerpos cromatoides los cuales están formados por agregados de hélices de ribonucleoproteínas, debido a que algunos autores mencionan que dichas hélices o cuerpos cromatoides se encuentran sólo en quistes inmaduros y no así en quistes maduros, procedimos a cuantificar el RNA total en trofozoitos y en las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. Para realizar la extracción total del RNA se empleó la Técnica de Trizol[®] según Laemli, 1970.

En la figura 37 se observa la relación de RNA total obtenido de trofozoitos y de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*, en la cual se observa que los trofozoitos presentan 6.90 veces mayor cantidad de RNA total que en las formas semejantes a quistes, cabe señalar que se partió del mismo número de células para este ensayo (5×10^6 cél/mL).

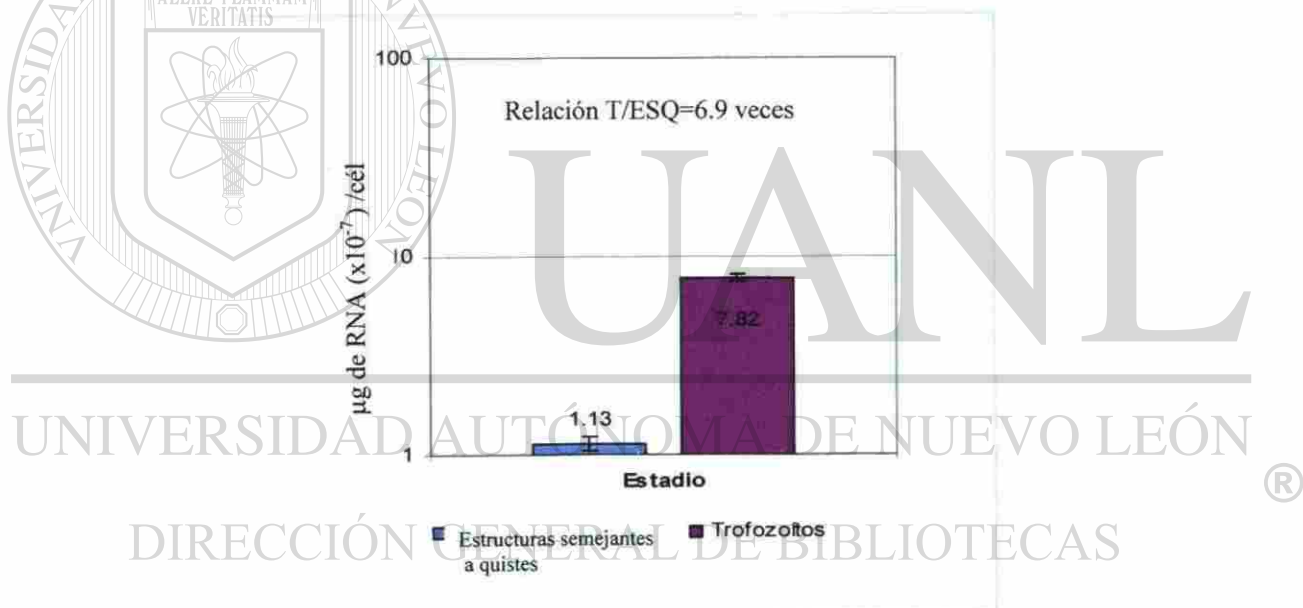


Figura 37. Cuantificación de RNA total en trofozoitos y estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. La relación de RNA total en trofozoitos es 6.9 veces mayor que en las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*.

Una vez que se aisló el RNA total por la técnica de Trizol[®] tanto de los trofozoitos como de las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*, se analizó en un gel de agarosa al 0.8%, (Fig. 38) a 100V durante 1 h y teñido con bromuro de etidio. En el gel se observó que sólo en los carriles en los cuales se corrió RNA total obtenido de trofozoitos se aprecian las bandas típicas; sin embargo en los carriles en donde se colocó RNA total obtenido de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* no se observaron bandas.



Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de RNA total. En el carril 1 se corrió muestra de RNA total de trofozoítos y en el carril 2 se corrió muestra de RNA total obtenida de estructuras semejantes a quistes, el RNA total fue extraído por el Método de Trizol®. En el carril 1 se observa claramente 3 bandas bien definidas, pero en el carril 2 correspondiente a ESQ no se observa ninguna banda.

7.10 DETERMINAR LA CI_{50} DE LA CAFEÍNA, EXTRACTO METANÓLICO DE *Castela texana*, TEOFILINA, NaF Y METRONIDAZOL EN CULTIVOS DE *Entamoeba histolytica*

Una vez obtenidos los parámetros de crecimiento, se realizaron ensayos para evaluar el efecto de diferentes agentes sobre el crecimiento axénico *in vitro* de trofozoítos *Entamoeba histolytica* al tercer día de crecimiento, que es cuando las células se encuentran en el máximo rendimiento celular (Fig. 10). Los resultados obtenidos se evaluaron empleando las Tablas B Probit (ver Anexo-A y Anexo-B). La determinación de la CI_{50} de diversos agentes sobre cultivos *in vitro* de *E. histolytica* se obtuvo a través de análisis Probit y empleando la ecuación $Y = mx + b$, los resultados se muestran en las figuras 39 a 43 y en la Tabla XI

A continuación se muestran los valores obtenidos al procesar y analizar los resultados obtenidos con cada agente químico empleando el método Probit, usando el paquete estadístico de SPSS-10, en los gráficos cada punto corresponde a tres determinaciones independientes por triplicado.

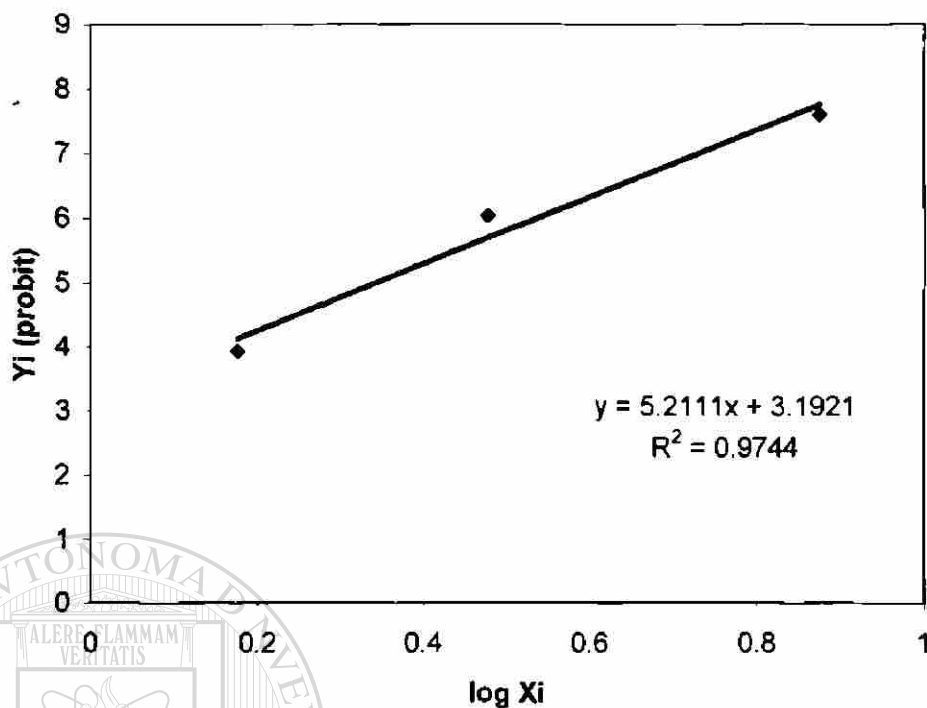


Figura 39. Diagrama de dispersión de las variables Y_i probit y $\log X_i$ del bioensayo de teofilina sobre cultivos de *E. histolytica*. A partir de las concentraciones evaluadas se obtuvo una R^2 0.97, valor de alta confiabilidad y de acuerdo a la ecuación obtenida se calculó el valor probit.

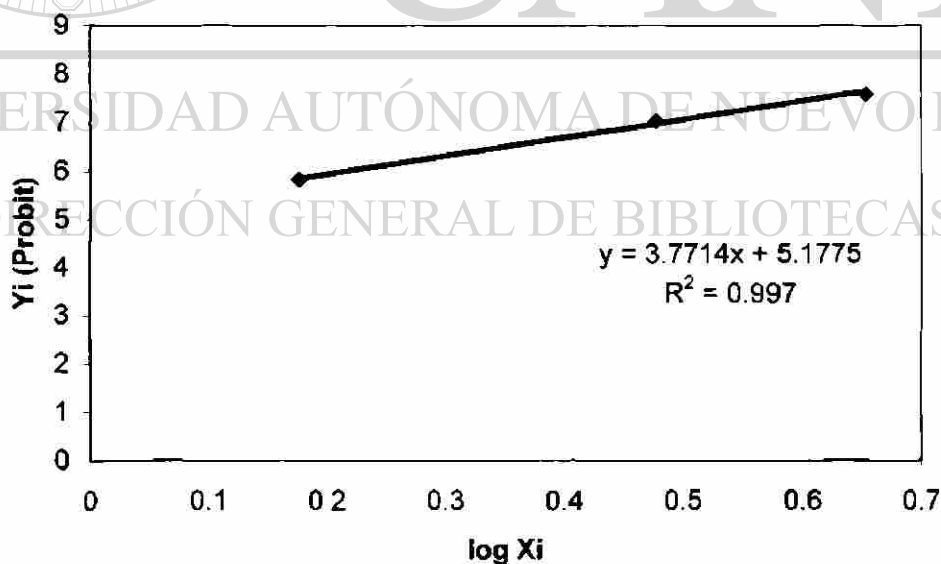


Figura 40. Diagrama de dispersión de las variables Y_i probit y $\log X_i$ del bioensayo de fluoruro de sodio (NaF) sobre cultivos de *E. histolytica*. A partir de las concentraciones evaluadas se obtuvo una R^2 0.99, valor de alta confiabilidad y de acuerdo a la ecuación obtenida se calculó el valor probit empleando las tablas B.

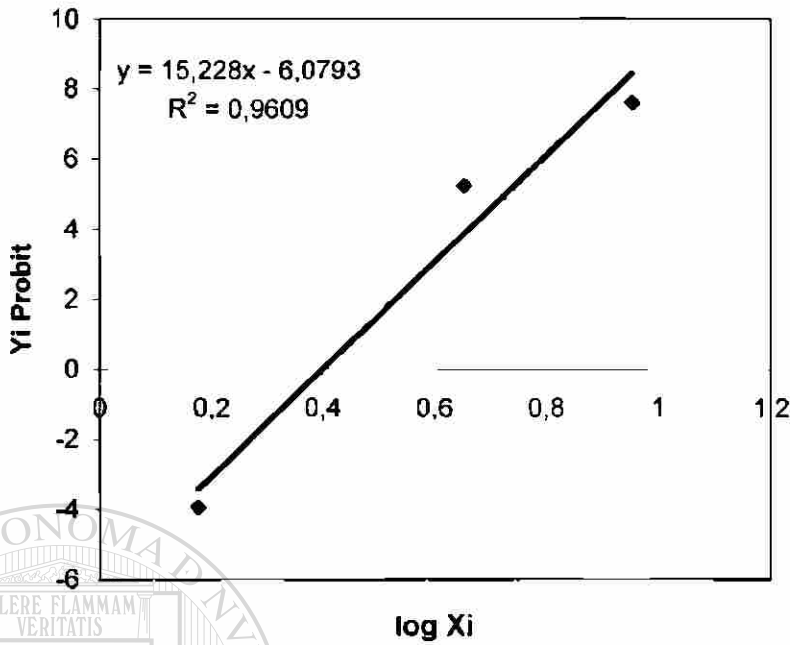


Figura 41. Diagrama de dispersión de las variables Yi probit y log Xi del bioensayo de la cafeína sobre cultivos de *E. histolytica*. En este ensayo se obtuvo una $R^2 = 0.96$, valor de alta confiabilidad y de acuerdo a la ecuación obtenida se calculó el valor probit empleando las tablas B.

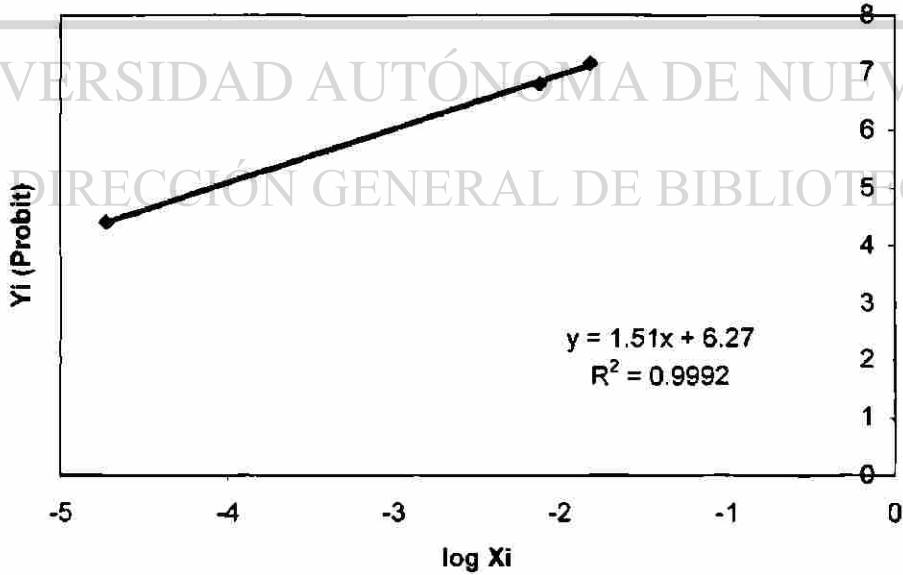


Figura 42. Diagrama de dispersión de las variables Yi probit y log Xi del bioensayo del metronidazol sobre cultivos de *E. histolytica*. En este gráfico se observa que a partir de las concentraciones evaluadas se obtuvo una $R^2 = 0.99$, valor de alta confiabilidad y de acuerdo a la ecuación obtenida se calculó el valor probit empleando las tablas B.

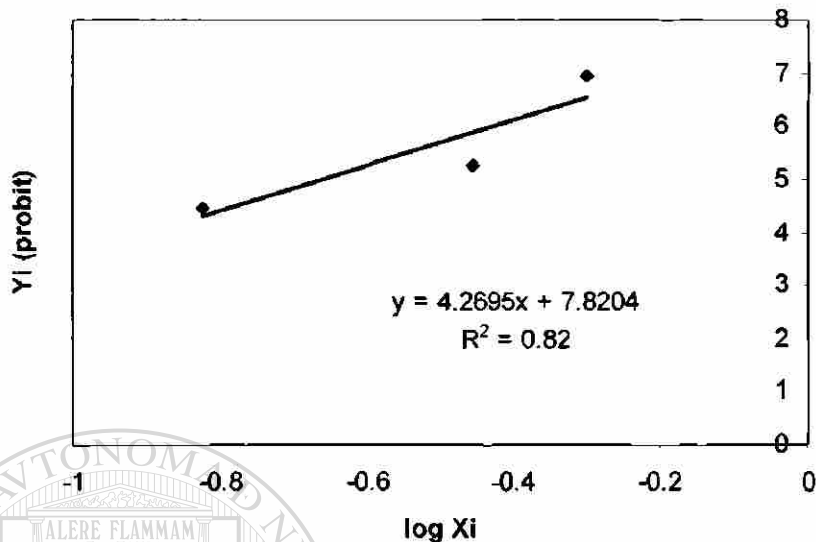


Figura 43. Diagrama de dispersión de las variables Yi probit y log Xi del bioensayo del extracto metanólico de *Castela texana* sobre cultivos de *E. histolytica*. De acuerdo a las concentraciones evaluadas del extracto metanólico de *C. texana*, se obtuvo una $R^2 = 0.82$, valor confiable y de acuerdo a la ecuación obtenida se calculó el valor probit empleando las tablas B.

Se encontró que la CI_{50} de los agentes químicos evaluados sobre *E. histolytica*, el metronidazol presentó el valor más bajo, seguido del extracto metanólico de *Castela texana*, NaF, teofilina y el valor más alto lo presentó la cafeína, como se muestra en la Tabla XI.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla XI

CI_{50} de diversos agentes sobre cultivos *in vitro* de *E. histolytica*

| Agente | CI_{50} (mg/mL) |
|--|-------------------|
| Teofilina | 2.222 |
| NaF | 0.8972 |
| Cafeína | 5.34 |
| Extracto Metanólico de <i>Castela texana</i> | 0.2185 |
| Metronidazol | 0.1442 μ g/mL |

7.11 EFECTO DEL CALCOFLÚOR M2r, METRONIDAZOL, CAFEÍNA, TEOFILINA, NaF Y EXTRACTO METANÓLICO DE *Castela texana* SOBRE LA INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS SEMEJANTES A QUISTES DE *Entamoeba histolytica*

Se evaluó el efecto de la concentración CI_{50} del metronidazol, NaF, cafeína, teofilina, del extracto metanólico de *Castela texana* y del calcoflúor M2r (como testigo negativo), sobre el rendimiento de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*, en los resultados obtenidos de los ensayos realizados con NaF, cafeína y teofilina (fig. 44) no muestran diferencia significativa con respecto al control y en los ensayos realizados con metronidazol y el extracto metanólico de *Castela texana* si muestran diferencia significativa con respecto al control; sin embargo no se observó diferencia significativa entre todos los agentes químicos evaluados (ver Anexo-C).

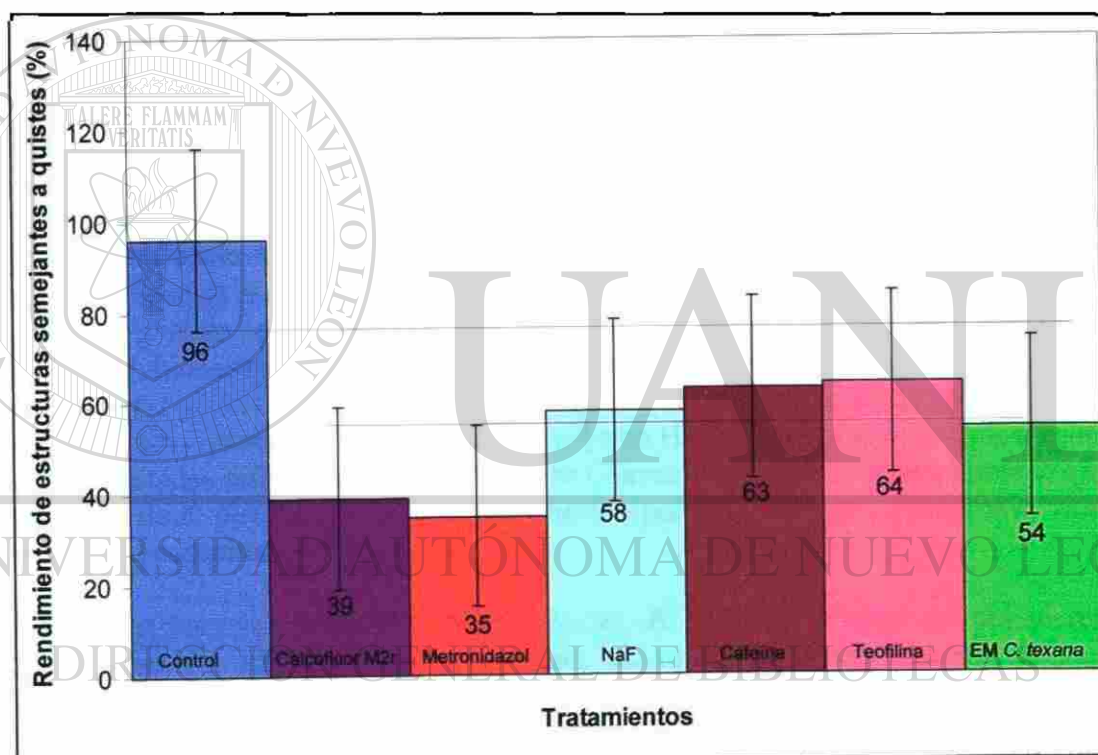


Figura 44. Evaluación de la acción de agentes químicos sobre la inducción de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. Rendimiento de estructuras semejantes a quistes (ESQ) de *E. histolytica* por acción del calcoflúor M2r (testigo negativo), metronidazol, NaF, cafeína, teofilina y extracto metanólico de *Castela texana*.

En este trabajo el calcoflúor M2r fue empleado como testigo negativo, dada su afinidad por polímeros de N-acetilglucosamina o quitina, lo cual puede explicar el bajo rendimiento de estructuras semejantes a quistes (39%) al impedir posiblemente la polimerización de la quitina. En tanto que el metronidazol actúa a nivel de DNA y esto pudiese repercutir directamente en el metabolismo integro de *E. histolytica*, lo cual puede explicar el mínimo rendimiento de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* obtenido.

8. DISCUSIONES

Hasta ahora no existen una metodología o medio que permita obtener quistes bajo condiciones axénicas de *Entamoeba histolytica in vitro*, debido al desconocimiento casi en su totalidad de las condiciones que imperan en el humano a nivel del intestino delgado, las cuales resultan inherentes al proceso de desenquistamiento, así como a nivel de intestino grueso, sitio en el cual se induce el enquistamiento de *Entamoeba histolytica*; por lo cual investigaciones referentes a este proceso permanecen áridas, dada la imposibilidad hasta ahora de desarrollar el ciclo de vida axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*.

En este trabajo el objetivo principal fue desarrollar una metodología o medio que nos permitiera desarrollar el ciclo de vida axénico *in vitro* de *E. histolytica*, para lo cual diseñamos una serie de bioensayos o estrategias experimentales; los cuales se describen en la Tabla VI, durante el desarrollo de estos bioensayos se empleó el medio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978); El proceso de enquistamiento (paso de la etapa de trofozoíto a quiste) resultó difícil de obtener, ya que después de realizar una serie de bioensayos, solamente se logró obtener esta etapa empleando el medio TYI-S-33 con glucosa en presencia de alta tensión con CO₂ e incubadas a 37°C por 7 días (Tabla VI, bioensayo 16) y de acuerdo a los resultados obtenidos la presencia de CO₂ es un factor necesario en nuestra metodología aquí reportada para que la inducción de estructuras quísticas de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS pueda llevarse a cabo, estos resultados difieren de lo reportado por Chávez *et al.*, 2003; quien menciona que las cepas de *E. histolytica* que han permanecido por largo tiempo en cultivos *in vitro* pierden su capacidad de enquistarse.

Las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* que se obtuvieron presentaron las siguientes características, al microscopio de luz observamos estructuras redondeadas y refringentes, las cuales también presentan la característica de ser multinucleadas esto quedó evidenciado al teñir estas estructuras con yodolugol, de igual manera se observó multinucleación al teñirlas con la tinción especial tricrómica de Gomori y al realizar la tinción en los cortes semifinos preparados para microscopía electrónica de transmisión también se observó multinucleación, todas estas características son típicas de quistes maduros de *E. histolytica*. En las estructuras semejantes a quistes que se obtuvieron en los ensayos realizados se observaron estructuras tetranucleadas, binucleadas y una proporción muy baja se observó mononucleada, no obstante presentaron resistencia a los detergentes sarcosyl y tritón X-100 a [0.15%], e incluso algunas estructuras semejantes a quistes inducidas con el método TGC7 permanecieron en el medio por cuatro años, al término de este lapso siguieron presentando fluorescencia en presencia de calcoflúor M2r (datos no mostrados). Para obtener los óptimos resultados en la inducción del enquistamiento, fue necesario emplear trofozoítos en óptimas condiciones (cerca de

la mitad de la fase log). El proceso de enquistamiento ha sido muy poco estudiado debido a la dificultad para inducirlo ya que desde finales del siglo XIX una serie de estudiosos de la amibiasis han intentado reproducir en forma masiva el ciclo de vida de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas, sin embargo hasta ahora no se ha reportado algún medio o método en el cual hayan logrado completar el ciclo de vida axénico *in vitro* de *E. histolytica*.

Los antecedentes que se tienen acerca de las características típicas de los quistes de *E. histolytica* son de muestras que se han obtenido de heces diarreicas ya que la mayoría de los autores refieren que estas muestras proceden de pacientes con disentería amibiana y en el curso de esta sintomatología las heces son diarreicas lo cual hace sospechar que aíslan sólo prequistes que no llegan a madurar a nivel de la luz del colon descendente de los pacientes debido a que son arrojados de una forma muy “violenta”. Este hecho puede dar origen a reportes falsos negativos, debido a que en las heces diarreicas será muy poco probable la presencia de quistes maduros tetranucleados e impactar directamente en los reportes epidemiológicos. Sin embargo existen pacientes infectados en los cuales no existe sintomatología alguna de la presencia de *E. histolytica* más que el análisis seriado de muestras fecales formadas y pastosas, que es en donde se llegan a encontrar quistes maduros tetranucleados, sin embargo considero que hace falta un estudio minucioso y detallado acerca de la morfología y fisiología de los quistes y del enquistamiento, para dar un seguimiento a detalle de cuales son aquellos quistes que se consideran o son realmente maduros e infectivos, cuanto tiempo resiste en el ambiente y del proceso de desenquistamiento, ya que los estudios que existen datan del siglo antepasado y mediados del siglo XX.

El análisis de las estructuras semejantes a quistes por microscopía electrónica de transmisión (MET) mostraron núcleos en diferentes etapas durante el proceso de diferenciación el cual ocurrió en presencia de alta tensión de CO₂, en estos cortes se observaron distintas posibles fases de la mitosis, como se ha observado en *Entamoeba invadens* (Morales *et al.*, 1989); la pared celular se observa delgada y las estructuras semejantes a quistes se observan regularmente esféricas, sin embargo está no es meramente una característica típica de un quiste obtenido de muestras de pacientes (Proctor y Gregory, 1973), en las muestras que ellos reportan se observan quistes con morfología no siempre esférica, como se observa en la figura 43.

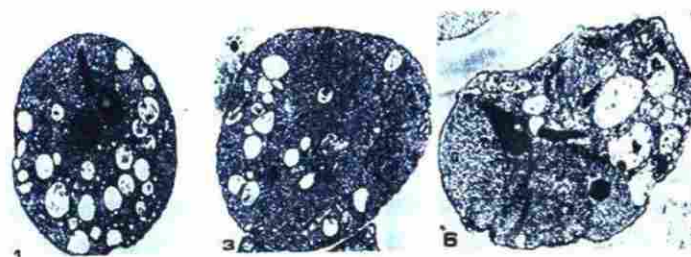


Figura 45. Morfología diversa de quistes de *E. histolytica*. Imágenes reportada por Proctor y Gregory, que muestra que los quistes de *E. histolytica* obtenidos *in vivo* no siempre son esféricos, tal como se les describe en la literatura

En cortes al MET de quistes obtenidos a partir de muestras de pacientes (Chávez *et al.*, 1978) se observa que la pared celular es más gruesa que la pared que presentan las estructuras semejantes a quistes encontradas en este trabajo; sin embargo la distribución vesicular es muy semejante como se observa en la figura 46.

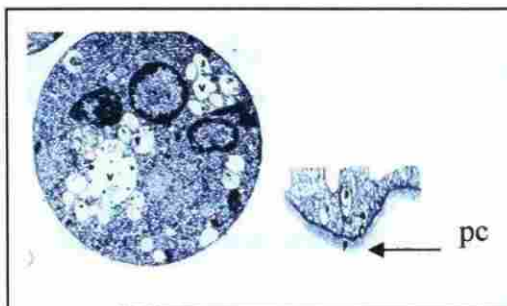


Figura 46. Quiste y pared celular de *E. histolytica*. Imagen reportada por Chávez, 1978.

Por otra parte las estructuras semejantes a quistes obtenidas *in vitro* con la metodología reportada en este trabajo no mostraron cuerpos cromatoides sólo escasas hélices de ribonucleoproteínas en trofozoítos prequísticos de *E. histolytica* al día 3 de encontrarse en incubación a 37°C bajo alta tensión de CO₂ en el medio TYI-S-33 (Figs. 21 y 22), sin embargo en un experimento preliminar realizado en este laboratorio por el Dr. Mario R. Morales V. en cultivos de *E. histolytica* empleando el medio PEHPS y cultivados bajo las mismas condiciones se encontró la presencia de cuerpos cromatoides muy escasos; sin embargo la presencia de estas estructuras en quistes maduros de *E. histolytica* es incierta ya que en tinciones de quistes de este parásito los mismos autores tienen discrepancia en la presencia de estos cuerpos cromatoides en quistes maduros, tal como lo señalan los siguientes autores:

“Los quistes jóvenes poseen 1 ó 2 núcleos, algunos cuerpos cromatínicos y vacuolas de glucógeno. Cuando el quiste madura, posee cuatro núcleos y desaparecen los cuerpos cromatínicos. Solo los quiste maduros son infecciosos” (Pumarola *et al.*, 1987).

“Los quistes son esféricos, miden entre 10 y 16 μ m de diámetro, poseen una pared de aproximadamente 0,5 μ m y contienen habitualmente 4 núcleos cuando están maduros. Los quistes jóvenes poseen además vacuolas con glucógeno y cuerpos cromatoides que disminuyen durante la maduración” (Perez *et al.*, 2002).

“Los quistes son formas redondas o ligeramente ovaladas de 8 a 20 μ m de diámetro, las cuales, en muestras sin teñir, se pueden ver como cuerpos hialinos con pared refringente. Su citoplasma es incoloro permitiendo la visualización de los llamados cuerpos cromatoides y núcleos en número de uno a cuatro (Martínez, 1982).

Sin embargo, a la fecha no existen trabajos detallados para descartar o confirmar estas afirmaciones, como podría ser el completar el ciclo de vida de *E. histolytica* a partir de quistes con o sin presencia de cuerpos cromatoides, que confirmen o descarten a que se le puede considerar como “quiste maduro” o “quiste infeccioso”.

Empleando inhibidores de síntesis de proteínas en trofozoítos reportan la presencia de hélices de ribonucleoproteínas o de cuerpos cromatoides, en quistes de *Entamoeba invadens*, por lo que concluyeron que la formación de las hélices de ribonucleoproteínas o cuerpos cromatoides inducidos por inhibidores de la síntesis de proteínas es un proceso espontáneo en el que los ribosomas “ociosos” provenientes de polisomas se agregan espontáneamente de forma cristalina (Kusamrarn *et al.*, 1975). Sin embargo aún en *E. invadens* existen discrepancias si los quistes inducidos *in vitro*, los cuales como característica esencial deben presentar cuerpos cromatoides son en realidad infectivos, debido a que no hay reporte alguno que lo descarte o lo confirme.

Existen una serie de trabajos que sustentan la idea de que los cuerpos cromatoides o hélices de ribonucleoproteínas 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 posterior utilización en una rápida proliferación celular en el subsiguiente proceso de desenquistamiento, aunque este proceso pueda también ser artificialmente inducido por inhibición de la síntesis de proteínas. Esto último es explicable por la aparente capacidad innata de agregación de los ribosomas no asociados a polisomas.

En trabajos previos realizados en *E. invadens* bajo condiciones de alta tensión de CO₂ y condiciones normales (Morales, 1991; Villarreal, 1990; Garibay, 1991 y Acevedo, 1993) se ha reportado la presencia de cuerpos cromatoides en trofozoítos en fase-log crecidos con alta tensión de CO₂, lo cual indica que las células se encontraban en crecimiento activo pero esta idea se contrapone con la suposición de que los cuerpos cromatoides sólo se encuentran en células de cultivo envejecido, o en células que se preparan para entrar en diferenciación (Barker y Deutsch, 1958).

Por otra parte los resultados del análisis de proteínas totales mediante electroforesis muestran mayor número de bandas en las estructuras semejantes a quistes que en trofozoítos (Fig. 36). Estos cambios en los patrones electroforéticos, de proteínas se presentan también en procesos de patogenicidad y diferenciación en los protozoarios parásitos; se ha observado que durante etapas tempranas del proceso de enquistamiento en *Trypanosoma cruzi* el proceso de transcripción de la ubiquitina desaparece, seguido por un incremento en los niveles de ubiquitina, (Algranati *et al.*, 2006). Eventos similares se han observado también en *E. invadens* (González *et al.*, 1999), por lo que es posible que estos mecanismos de regulación de degradación de proteínas jueguen también un papel importante en el proceso de diferenciación de *Entamoeba histolytica* (Algranati *et al.*, 2006). Si bien los resultados obtenidos en este trabajo no muestran evidencia en que tipo de proteínas aparecen o desaparecen durante el enquistamiento, sí nos habla de notables cambios en el contenido proteico durante este proceso, cambios que serán objetivo de trabajos futuros así como el análisis comparativo entre los trofozoítos, estructuras semejantes a quistes y quistes obtenidos de pacientes con amibiasis.

Al cuantificar los niveles de RNA total tanto en trofozoítos como en las estructuras semejantes a quistes se observó 6.9 veces mayor cantidad en los trofozoítos que en las estructuras semejantes a quistes (Figs. 37 y 38), estos resultados pueden deberse a

que la técnica aquí empleada para la purificación del RNA total (Técnica de Trizol[®]) no fue la adecuada para aislar RNA total a partir de las estructuras semejantes a quistes, dado que la cubierta de quitina posiblemente es resistente a los ácidos y no fue suficiente el tiempo de acción del Trizol[®] para romper la cubierta de quitina de las estructuras semejantes a quistes. Por lo cual sería recomendable realizar una serie de ensayos para evaluar cual es la mejor técnica para extraer el RNA total de las estructuras semejantes a quistes de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.

Las observaciones llevadas a cabo de las estructuras semejantes a quistes a través del microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy) y al microscopio de fuerza atómica, revelan que la topografía es rugosa, formada por una serie de fibrillas que bordean la superficie de ésta estructura quística, el único antecedente gráfico con que se cuenta es la imagen reportada por Martínez, 1987; (Fig. 47) en la cual muestra un agregado de “quistes de *E. histolytica*” vistos al MEB y refiere que fueron aislados a partir de heces fecales de un paciente con amibiasis, sin embargo en mi experiencia personal durante el desarrollo de este trabajo así como experiencia laboral en el área clínica, en las muestras de pacientes sintomáticos o asintomáticos para amibiasis, los quistes siempre se encuentran aislados y nunca en agregados, esta observación ha sido compartida por 7 colegas que trabajan constantemente con muestras de pacientes, por lo que estas observaciones *in vivo* distan de ser iguales a las reportadas por Martínez, 1987; sin embargo *in vitro* se ha observado la formación de estructuras esféricas en agregados al emplear diversos métodos e incluso de forma espontánea al emplear el medio PEHPS o TYI-S-33 para inducir el enquistamiento de *E. histolytica*, esta característica de agregarse también se ha observado durante el enquistamiento *in vitro* en *E. invadens* (Fig. 48), pero no se ha descrito que a partir de muestras *in vivo* presenten esta característica de agregarse.



Figura 47. Quistes de *E. histolytica*. Quistes obtenidos de pacientes con amibiasis, imagen reportada por Martínez, 1987.

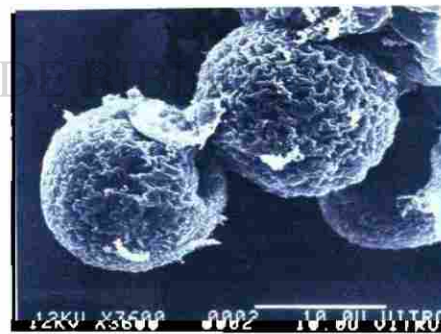


Figura 48. Quistes de *E. invadens*. Quistes obtenidos *in vitro* y reportados por Morales, 1989.

Al microscopio de fuerza atómica, el análisis topográfico de las estructuras semejantes a quistes obtenidos en este trabajo, evidencia que la pared está formada por una cubierta tipo malla o red de quitina y de acuerdo con el análisis topográfico, la altura promedio de la malla es de 800Å, la imagen al microscopio de fuerza atómica es la primera que se reporta para una estructura quística de *Entamoeba histolytica* obtenida *in vitro* bajo condiciones axénicas.

Al tratar de inducir el enquistamiento *in vitro* una serie de investigadores han suplementado los medio de cultivo con suero de diverso origen, sin embargo resulta paradójico estar suplementando a estos trofozoítos con factores de crecimiento que comúnmente se encuentran en el suero, cuando lo que se busca es inhibir su crecimiento para que permita entrar en fase de enquistamiento, ya que evaluando las condiciones *in vivo* a las que se someten los trofozoítos de *E. histolytica* predomina un ambiente denso con condiciones de anaeróbiosis, en donde son escasos los nutrientes como la glucosa, hierro, lípidos o proteínas y cabría el preguntarse ¿Porqué para inducir el enquistamiento *in vitro* suplementamos los medios con suero?, también podríamos replantearnos el papel de las bacterias ácido lácticas en este proceso ya que son parte de la flora normal en individuos sanos. En uno de los diseños experimentales (Tabla VI, bioensayo 18) eliminamos nutrientes del medio TYI-S-33 y sólo dejamos las sales pero obtuvimos resultados pobres; por lo cual cabría la posibilidad de replantearse si los medios empleados hasta ahora son los ideales para inducir el enquistamiento de *E. histolytica*. Al parecer el factor condicionante para inducir el enquistamiento es el CO₂, la escasez de nutrientes y la reducción del medio TYI-S-33 cuyo pH al final fue de 6.1, aunado a la incubación por un lapso de 7 días en el medio TYI-S-33. Asimismo, cabría la posibilidad de realizar más estudios sustituyendo el suero por el PACSR (Mata *et al.*, 1996) para inducir el enquistamiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* ya que en *Entamoeba invadens* se ha tenido éxito al sustituir el suero por el PACSR en el proceso de enquistamiento (Barrón *et al.*, 2005).

El proceso de desenquistamiento resultó muy complejo en comparación con el enquistamiento, una vez que se obtuvieron estructuras quísticas resistentes a detergentes de la mayoría de los bioensayos, fueron colocados en medio para desenquistamiento, bajo la única condición en la cual se cumplió el ciclo de vida completo fue lavarlos con tritón X-100 a 0.0001% por 30 min, enjuagarlos muy bien con TYI-S-33 y reincubarlos en TYI-S-33 por 12 días, este fue uno de los bioensayos más sencillos que realizamos y en el cual se cumplió el ciclo de vida bajo condiciones axénicas de *E. histolytica in vitro*. Durante esta fase se observó una cantidad muy escasa de estructuras semejantes a quistes que cumplen el ciclo de vida, llegando a formar una nueva población en un lapso de 23 días aproximadamente. Un comportamiento similar se ha observado en proceso de desenquistamiento de otros protozoarios parásitos en experimentos *in vitro* como *E. invadens* y *Giardia lamblia* (Boucher y Guillin, 1990). Estos resultados fueron corroborados con repetición del bioensayo, de donde se desprende que el factor condicionante para el ciclo de vida de *E. histolytica* es partir de trofozoítos en excelentes condiciones de cultivo, ayuno de glucosa y alta tensión de CO₂. Al término de este trabajo, por primera vez se da evidencia del desarrollo del ciclo de vida axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*.

La inhibición de la inducción de estructuras semejantes a quistes por factores como teofilina, cafeína y fluoruro de sodio indican la posibilidad de la participación del AMP-cíclico en el proceso de diferenciación de *E. histolytica*, posibilidad no remota, ya que es conocida la acción de nucleósidos fosforilados en la diferenciación de organismos que presentan una fase amiboidea en su ciclo de vida como ocurre en *Dyctiostelium discoideum* (Gerish, 1987).

Recientemente, se ha reportado que a partir de *Castela texana* se aisló la chaparrina la cual ha mostrado actividad inhibitoria sobre el proceso de diferenciación de *Entamoeba invadens* bajo condiciones axénicas *in vitro* (Calzado *et al.*, 2007) sin embargo, no es conocido a que nivel tiene su acción inhibitoria.

El hecho de que las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* que lograron el desenquistamiento fueron únicamente aquellas que se sometieron a concentraciones bajas de tritón x-100 (0.0001%). Aunque esta concentración es suficiente para matar trofozoítos apoya la presencia de una pared protectora de la membrana celular, pero también sugiere que esta pared debe ser delgada, con menor grosor que la del quiste formado *in vivo*, lo que concuerda también con lo observado en la fotografía al MET (Fig.24) en los cuales la pared celular se observa mucho menos gruesa que en los quistes formados *in vivo* como se observa en la figura 46.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los trofozoítos pueden ser inducidos axenicamente *in vitro* a diferenciarse a estructuras con las características de un quiste de *Entamoeba histolytica* y que colocadas en un medio de crecimiento estas estructuras pueden desenquistarse o diferenciarse y formar nuevamente trofozoítos típicos con capacidad de volver a formar nuevamente estructuras quísticas, es decir el ciclo de vida de *E. histolytica* se logró reproducir axenicamente *in vitro*, lo cual fue el objetivo principal de esta tesis. De esta manera la metodología presentada en este trabajo puede ser una base importante para el estudio de la biología del enquistamiento de *E. histolytica* y abrir un nuevo frente hacia el control de la amibiasis al romper el ciclo de vida de este parásito precisamente sobre su fase infectiva: el quiste.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

9. CONCLUSIONES

- 1.- Empleando el medio TYI-S-33 y el Método TGC7 se logró reproducir el ciclo de vida axénico de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS *in vitro*.
- 2.- Para la inducción de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* que logren reproducir el ciclo de vida bajo condiciones axénicas *in vitro* es indispensable:
 - a) emplear trofozoítos en excelentes condiciones de cultivo.
 - b) reducir el potencial REDOX del medio TYI-S-33 empleando CO₂.
 - c) disminución de nutrientes en el medio TYI-S-33.
- 3.- Las estructuras semejantes a quistes obtenidas bajo condiciones axénicas *in vitro* presentan las siguientes características:
 - a) Son estructuras esféricas, la mayoría se encuentran distribuidas individualmente y en baja proporción se encuentran en agregados y sus dimensiones fluctúan de 10 a 40µm.
 - b) Presentan una pared celular delgada.
 - c) Presentan resistencia al tritón X-100 hasta 0.15% por 30 min.
 - d) Al microscopio de luz UV fluorescen intensamente en presencia de calcofluor M2r.
 - e) Son estructuras multinucleadas.
 - f) Carecen de cuerpos cromatóides, sólo presentan escasas hélices de ribonucleoproteínas
- 4.- El desenquistamiento de *E. histolytica* en el medio TYI-S-33, bajo condiciones axénicas *in vitro* es asincrónico.
- 5.- El extracto metanólico de *Castela texana* aún no siendo un compuesto puro inhibe significativamente la inducción de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*.
- 6.- Las sustancias puras NaF, cafeína, teofilina inhiben la inducción de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*, sin embargo no presentan diferencia significativa entre si y con respecto al control.

10. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, empleando el método TGC7 aquí descrito, permitirá en un futuro poder realizar trabajos enfocados al estudio y elucidación de los mecanismos celulares y moleculares involucrados durante cada etapa del ciclo de vida axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, también es de importancia el descifrar los factores clave implicados en el proceso de enquistamiento y desenquistamiento, así como realizar estudios de aspecto inmunológico que permitan establecer el mecanismo de acción de *E. histolytica* en pacientes con amibiasis franca y el comportamiento de *E. histolytica* en portadores asintomáticos, todos estos estudios en su conjunto encaminados a inhibir el ciclo de vida de *E. histolytica*. Aunque existe una considerable cantidad de estudios en los cuales evalúan el efecto de una gran cantidad de agentes químicos sobre el crecimiento de *E. histolytica*, sería conveniente realizar la búsqueda de nuevos fármacos que presenten menos efectos secundarios indeseables que el metronidazol y una buena opción de acuerdo a los resultados obtenidos sería la obtención de sustancias puras derivadas *Castela texana*, así como analizar el modo de acción de los agentes químicos aquí evaluados (NaF, cafeína y teofilina) y en un futuro emplear el conocimiento adquirido hacia el control de la amibiasis tanto a nivel del hospedero como del ambiente.

11. LITERATURA CITADA

Acevedo Garibay, M.A., 1993. Niveles de RNA en trofozoítos de *Entamoeba invadens* cepa IP-1 crecidos axenicamente con tensión normal y alta tensión de CO₂ en medio TYI-S-33 sin vitaminas. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL, Monterrey, N.L.

Algranati, D.I., Serra M. P., Carrillo C. y González. N., 2006. Modulation of oat arginine decarboxylase gene expression and genome organization in transgenic *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Federation of Biochemical Societies Journal* **273**:628-637.

Arroyo-Begovich, A., Carabéz-Trejo A., Ruiz-Herrera, J., 1980. Identification of the structural components in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *Journal of Parasitology* **66**:735-741.

Arroyo-Begovich, A., Carabéz-Trejo A., 1982. Location of chitin in the wall of *Entamoeba invadens* with colloidal gold tracers. *Journal of Parasitology* **68**:253-258.

Avron B, Stolarsky T., Chaayen A, Mirelman D., 1986. Encystation of *E. invadens* IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. *Journal of Protozoology* **33**:522-525.

Avron, B., R. M. Deutsch, and D. Mirelman. 1982. Chitin synthesis inhibitors prevent cyst formation by trophozoites. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **108**:815-821.

Balamuth, W., 1946. Improved egg yolk medium for cultivation of *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa. *American Journal of Clinical Pathology* **16**:380-384.

Barker, D.C. y Deutsch, K., 1958. The chromatoid body of *Entamoeba invadens*. *Experimental Cell Research* **15**:604-639.

Barrón-González, M.P., Villarreal-Treviño, L., Verduzco-Martínez, J.A., Mata-Cárdenas B.D., y Morales-Vallarta M.R., 2005. *Entamoeba invadens*: *In vitro* axenic encystation with a serum substitute. *Experimental Parasitology* **110**:318-321.

Batchricki-García, S. 1989. The biochemical cytology of chitin and chitosan synthesis in fungi. In *Chitin and Chitosan*. Ed. By Skjak-Brack G., Anthousen T. And Sadford P. London; Elsevier Applied Science, pp.23-36.

Boeck, W.C. and Drbohlav, J., 1925. The cultivation of *Endamoeba histolytica*. *American Journal of Hygiene* 5:371-407.

Boucher, S.E. y Guillin F.D., 1990. Excystation of *in vitro*-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infection and Immunity* 58:3516-3522.

Bray, R.S. 1996. Amoebiasis, The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases. The Wellcome Trust, London, United Kingdom. In F.E.C.Cox (ed), pp. 170-177.

Burk R.R., 1968. Reduced adenyl ciclase activity in a polyoma virus transformed cell line. *Nature* 219:1272-1275.

Byers, T.J. 1986. Molecular biology of DNA in *Acanthamoeba*, *amoeba*, *Entamoeba* and *Naegleria*. *International Journal of Cytology* 99:311-341.

Caballero-Salcedo, A., M. Viveros-Rogel, B. Salvatierra, R. Tapia-Conyer, J. Sepúlveda-Amor, G. Gutiérrez, and L. Ortiz-Ortiz. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50:412-419.

Calzado-Flores C., Verde-Star J., Morales-Vallarta M., Segura-Luna J.J., 2007. Inhibición del proceso de enquistamiento de *E. invadens* por *Castela texana*. *Revista Ciencia UANL* 10:44-48.

Campos-Góngora E, Ebert F, Willhoeft U, Said-Fernández S, Tannich E. 2004. Characterization of chitin synthases from *Entamoeba*. *Protist* 155:323-330.

Carliss J.O., Gojides M, Hall R.D., Kudo R.R., Levine N.D., Loeblich A.R., Jr Weiser J. and Wenrich D.H. 1969. A revised classification the phyllus protozoa. *Journal of Protozoology* 12:11-17.

Cervantes-Mamoa A. y Martínez-Palomo, A., 1980. Estudio del ciclo vital de *Entamoeba invadens* mediante cinematografía espaciada. *Archivos de Investestigación Médica (México)* 11:31-40.

Chang S. L., 1946. Studies in *Entamoeba histolytica* IV. The relation of oxidation reduction potentials to the growth, encystations and excistations of *Entamoeba histolytica* in culture. *Journal of Parasitology* 37:101-112.

Chávez-Munguía B., Martínez Palomo A., De la Torre M., 1978. Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de *Entamoeba invadens*, *E. histolytica* y *E. coli*. Archivos de Investigación Médica **9**:113-116.

Chávez-Munguía B., Cristóbal-Ramos AR., González-Robles A., Tsutsumi V., and Martínez-Palomo A., 2003. Ultrastructural study of *Entamoeba invadens* encystation and excystation. Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology **35**:235-243.

Chávez-Munguía B., Hernández-Ramírez V., Angel A., Rios A., Talamas-Rohana P., González-Robles A., González-Lazaro M., Martínez-Palomo A., 2004. *Entamoeba histolytica*: ultrastructure of trophozoites recovered from experimental liver lesions. Experimental Parasitology **107**:39-46.

Chinn B., Jacobs L., Reardon L. and Rees C., 1942. The influence of the bacterial flora on the cultivation of *Entamoeba histolytica*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **22**:137-146.

Clark, C.G., Espinosa Cantellano, M. and Bhattacharya, A. 2000 *Entamoeba histolytica*: an overview of the biology of the organism. in: Amebiasis (Ravdin J.I., ed.) Imperial College Press, London, pp. 1-45.

Clark, C.G., and L.S. Diamond. 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clinical Microbiology Reviews **15**:329-341.

Cleveland, L.R. and Sanders, E.P., 1930. The production of bacteria-free amoebic abscesses in the liver of cats and observations on the amoebae in various media with and without bacteria. Science **77**:149-151.

Councilman, W. T., and H. A. Lafleur., 1891. Amebic dysentery. Johns Hopkins Hospital Reports **2**:395-548.

Crosby, A. W., 1986. Ecological imperialism : the biological expansion of Europe, 900-1900. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.

Das S.R., Rastogi, A.K., Sagar P., y Singh, M.P., 1980. Axenic encystation of *Entamoeba invadens*. Indian Journal of Experimental Biology **18**:333-336.

Das S.R. y Guillin F.D., 1991. Chitin synthase in encysting of *Entamoeba invadens*. Biochemical Journal **280**:641-647

Diamond L.S., 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science **134**:336-337.

Diamond L.S., 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoeba. *Journal of Parasitology* **54**:1047-1056.

Diamond L.S., Harlow D. y Cunnick C.C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**:431-432.

Diamond L.S. y Cunnick C.C., 1991. A serum-free, partly defined medium, PDM-805, for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* schaudinn and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**:431-432.

Diamond, L.S. y Clark, C.G., 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *Journal of Eukariotic Microbiology* **40**:340-344.

Dobell, C. y Laidlaw, P.P., 1926. On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoebae. *Parasitology* **18**:238-318.

Dobell C., 1928. Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I. General Introduction, II. Description of the whole life-history of *Entamoeba histolytica* in culture. *Parasitology* **20**:357-412.

Dobell C., 1932. Antony van Leeuwenhoek and his "little animals". John Bale Sons and Danielsson, London, United Kingdom, pp.224-225.

Fahey, R.C., Newton G.L., Arrick B., Overdank-Bogart, T. Y Aley S.B., 1984. *Entamoeba histolytica*: a eukariote without glutathione metabolism, *Science* **224**:70-72.

Feria-Velasco A. and Tapia-Arizmendi G., 1977. Qualitative X-ray spectrometric study of *E. histolytica* trophozoite nuclei. *Archives of Medical Research* **8**:199-208.

Frye, W.W. y Melenay, H.E., 1939. Liver extract as a substitute for serum in the culture medium for *Entamoeba histolytica*. *Science* **89**:564-565.

Garibay de Hoyos, C.A., 1991. Niveles de RNA en trofozoítos de *Entamoeba invadens* IP-1 crecidos axenicamente en medio TP-S-1 con tensión normal y alta tensión de CO₂. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Monterrey, N.L.

García, L.S., and D.A. Bruckner. 1997. *Diagnostic medical parasitology*, 3rd ed. ASM Press.

Gerisch, G., 1987. Cycline AMP and other signals controlling cell development and differentiation in *Dictyostelium*. *Annual Review of Biochemistry* **56**:853-879.

González A.R., Haque R., Rehman T., 1992. A monoclonal antibody for distinction of invasive and noninvasive clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology* **30**:2807-2813.

González J., Guangxing B., Frevert U., Corey, E. J. y Eichinger D., 1999. Proteasome-dependent cyst formation and stage-specific ubiquitin mRNA accumulation in *Entamoeba invadens*. *European Journal of Biochemistry* **264**:897-904.

Gutiérrez G. y Muñoz O., 1994. Epidemiología de la amibiasis. Ed. Kretschmer R. Amibiasis, Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas.

Horsch M., Mayer C, and Rast D.M., 1996. Stereochemical requirements of chitin synthase for ligand binding at the allosteric site for N-acetylglucosamine *European Journal of Biochemistry* **237**:476-482.

Horst M.N., 2005. The biosynthesis of crustacean chitin by a microsomal enzyme from brine shrimp. *Journal of Biological Chemistry* **10**:1412-1419.

Imperato P.J. 1981. A historical overview of amebiasis. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* **57**:175-187.

Ivey, M. 1980. Phylum Protozoa, *In* A. C. Sonnenwirth and L. Jarett (ed.), *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. The C. V. Mosby Co., St. Louis, Mo, pp. 2081-2093.

Jackson T, 2000. Epidemiology. En: Ravdin J.I., editor. *Amebosis*. Londres: Imperial College Press, pp.47-63.

Kapoor O. P., 2006. Amoebic liver abscess. *Bombay Hospital Journal* **48**:4-6.

Katz M., Despommier DD. and Gwadz RW. 1989. *Parasitic diseases*. Springer-Verlag, New York, N.Y., pp.129-135.

Kartulis, S. 1886. Zur etiologie der dysenterie in Aegyptien. *Virchows Archives A: Pathological Anatomy and Histopathology* **105**:521-531.

Kean, B.H., 1988. A history of amebiasis., *In* J. I. Ravdin (ed.), *Amebiasis: human infection bu Entamoeba histolytica*. John Wiley&Sons, Inc., New York, N.Y., pp.1-10.

Kessel, J., Allison, D., Kaime, M., Quiros, M. y Gloeckner, A., 1944. The cysticidal effects of chlorine and ozone on cysts of *Entamoeba histolytica*, together with a comparative study of several encystment media. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **24**:177-183.

Kusamram, T., Sobhon, P., Bailey, G.B., 1975. The mechanism of formation of inhibitor induced ribosome helices in *Entamoeba invadens*. *The Journal of Cell Biology* **65**:529-539.

Lambl, V., 1859. Microscopische untersuchungen der darmexcrete. Beitrag zur pathologisches des darmes und zur diagnostik am krankenbette. *Viert. Prakt. Heilkd. (Prague)* **61**:1-57.

Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Lazos Ochoa M., 1994. Patología y patógena de la amibiasis, Segunda Reunión de Expertos en amibiasis. SERLE, Primera Edición 41-52.

Levine N.D., Carliss J.O., Cox F.E.G., Deroux G., Grain J., Honinger B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lin D., Lom J., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljanski G., Sprague V., Vavra J. and Walalace F.G., 1980. A new revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology* **27**:37-58.

Lösch F.A., 1875. Massive development of amoebae in the large intestine. *Arch. F. Path. Anat.*, LXV 196.

López-Romero, E. y Villagómez-Castro, J.C., 1993. Encystation in *Entamoeba invadens*. *Parasitology Today* **9**:225-227.

Loftus B., Anderson I., Davies R., Alsmark UCM., Samuelson J., Amedeo P., Roncaglia P., Beriman M., Hirt R.P., Mann B.J., Nozaki T., Suh. B., Pop M., Duchene M., Ackers J., Tannich E., Leippe M., Hofer M., Brucchhaus I., Willhoeft U., Bhattacharya A., Chillingworth T., Churcher C., Hance Z., Harris B., Harris D., Jagel K., Moule S., Mungall K., Ormond D., Squares R., Whitehead S., Quail M.A., Rabbinowitsh E., Norbertczak H., Price C., Wang Z., Guillén N., Grilchrist C., Stroup S.E., Bhattacharya S., Lohia A., Foster P.G., Sicheritz-Ponten T., Weber C., Singh U., Mukherjee C., El-Sayed N.M., Petri W.A., Clark C.G., Embley M.T., Barrell B., Fraser C.M., Hall N. 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**:865-868.

Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S. & Takeuchi, T., 2004. Different effects of cytochalasins on the growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. *Parasitology Research* **93**:68-71.

Martínez-Palomo A.. 1982. The biology of *Entamoeba histolytica*. Primera Edición. Research studies Press-John Wiley & Sons LTD. pp 161.

Martínez-Palomo A., 1986. The biology of *Entamoeba histolytica*. Ed. Elsevier, Amsterdam, 2:11-43.

Martínez-Palomo A. 1987. Las amibas enemigos invisibles. Fondo de Cultura Económica, SEP. México, D.F.

Martínez-Palomo A. y Espinosa-Cantellano M., 2003. *Entamoeba histolytica*: Biología Celular y Molecular. Cap. 24. pp. 741-760.

Markell. E. K., D. T. John, and W. A. Krotoski., 1999. Lumen-dwelling protozoa, 8th ed. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.

Mata-Cárdenas, B. D. y Saíd-Fernández, S., 1986. Wall synthesis in axenic cultures of *E. histolytica* grown in PEHPS medium. Archives of Medical Research 25:25-30.

Mata-Cárdenas, B.D., Morales Vallarta M.R., Vargas Villarreal J. y Saíd-Fernández, S., 1996. PACSR: A serum replacement for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* in a serum-free media. Archives of Medical Research 28:106-107.

McLaughlin, J.. and S. Aley. 1985. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. Journal of Protozoology 32:221-240.

McConnachie E. W., 1962. A medium for the axenic cultivation of *E. invadens*. Nature 194:603-604.

McConnachie E. W., 1969. The morphology, formation and development of cyst of *Entamoeba*. Parasitology 59:41-53.

Meleney H.E., Snyder T.L., 1940. The excystation of *Endamoeba histolytica* in bacteriologically sterile media. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 21:63-73.

Merz R.A., Horsch M., Nyhlen L.E. and Rost D.M., 1999. Biochemistry of chitin synthase. In chitin and chitinases. Ed. By Jolles P. And Muzzarelli RAA, Switzerland pp.9-37.

Monwell, M.D., 1968. Introduction to protozoology. Second revised edition., Dover Publications Inc., New York. P:85.

Morales-Vallarta M, Mata BD, Ramirez-Bon E, Segura JJ. 1982. Nuclear division and presence of microtubules in the differentiation of *Entamoeba invadens*. Archives of Medical Research 3:211-216.

Morales-Vallarta M., Carranza-Rosales M., Ruiz-Ordoñez J., Verduzco-Martinez J., 1989. Cell wall morphogenesis during differentiation of *Entamoeba invadens* (Protozoa: Sarcodina). Transactions of the American Microscopical Society 108:204-207.

Morales-Vallarta M. R, 1991. Inducción de cuerpos cromatoides en trofozoitos que crecen en fase log y diferenciación de *Entamoeba invadens* por alta tensión de CO₂ Aspectos en la formación de la pared del quiste. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL., Monterrey, N.L.

Morales-Vallarta M. y Villarreal-Treviño L., 1997. *Entamoeba invadens* differentiation and *Entamoeba histolytica* cyst-like formation induced by CO₂. Archives of Medical Research 28:150-151.

Moran P., Ramos F., Ramiro M., Curiel O., González E., Valadez A., Gómez A., García G., Melendro E.I., Ximénez C. 2005. *Entamoeba histolytica* and/or *Entamoeba dispar*: Infection frequency in HIV⁺/AIDS patients in México city. Experimental Parasitology 110:331-334.

Muñoz M.L., Lamoyi E. and León G., 1990. Antigens in electron-dense granules from *Entamoeba histolytica* as possible markers for pathogenicity. Journal of Clinical Microbiology 28: 2418-2424.

Nayeem MA, Habibullah CM, Saleem Y, Quadri GS, Ishaq M., 1993. *In vitro* encystation and excystation of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Indian Journal Experimental Biology 6:562-563.

Neff R.J. y Benton W.F., 1964. Localization of cellulose in the cysts of *Acanthamoeba* sp. Journal of Protozoology 9:11-13.

Nelson E.C., 1947. Alcoholic extract medium for the diagnosis and cultivation of *Entamoeba histolytica*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 27:545-552.

OMS, 1997. Amoebiasis-An expert consultation. Weekly Epidemiological Record No.14. Ginebra, Abril.

Osler, W. 1890. On the amoeba coli in dysentery and in dysenteric liver abscess. Bulletin of The John Hopkins Hospital 1:53-57.

Pall M.L., 1981. Adenosine 3'-5'-monophosphate in fungi. *Microbiological Reviews* 45:462-480.

Pérez-Arellano, J.L., Muro-Álvarez A., Hernández-Caballero M. y Martín-Sánchez A.M. 2002. Amebosis. *Medicine* 8:3731-3741.

Petri W.A., Jackson T.F., Gathiram V. 1990. Pathogenic and non pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infection and Immunity* 58:1802-0806.

Proctor E.M. and Gregory M.A. 1973. Ultrastructure of cysts of *E. histolytica*. *International Journal of Parasitology* 3:455-456.

Pumarola, A.; Rodríguez Torres, A.; García Rodríguez, J.A; Piedrola Angulo G. 1987. *Microbiología y Parasitología Médica*. 2 Edición. Barcelona: Salvar Editores. S. A., p.908.

Quinke, H., and E. Ross. 1893. Ueber Amöben-Enteritis. *Berl. Klin. Wochenscher.* 30:1089-1094.

Rengpein S., Bailey G. B., 1975. Differentiation of *Entamoeba*: a new medium and optimal conditions for axenic encystation of *Entamoeba invadens*. *Journal of Parasitology* 61:24-30.

Reed S.L. y Flores MB., 1992. Molecular and cellular characterization of the 29 kilodalton peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infection and Immunity* 60:542-549.

Romero-Caballero R., 1994. Introducción de amibiasis, Segunda reunión de expertos, Primera Edición, SEARLE de México, pp:47-55.

Rivera P.R. y Correa-Lemus I., 1986. Enquistamiento axénico de *E. histolytica*. *Archivos de Investigación Médica (Mex.)* 17:19-23.

Sargentum P.G., Williams J.E., Grene J.D. 1978. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72:519-521.

Schaudinn, F. R., 1903. On the development of some Rhizopoda (Preliminary Report) En: Kean B. H., Mott K.E., Russell A.J., eds. *Tropical Medicine and Parasitology Classic Investigations*, London United Kingdom: Cornell University Press; 1978. 1:110-118.

Schaumburg, H. H., Spencer P.S., Thomas P.K., 1983. Toxic neuropathy: Pharmaceutical agents. In disorders in peripheral nervs. Contemporary neurology series. Phyladelphia, pp.119-130.

Saíd-Fernández, S., Vargas Villarreal, J., Castro-Garza., Mata-Cárdenas, B.D., Navarro-Marmolejo, L., Lozano Garza, G y Martínez-Rodríguez, H., 1988. PEHPS medium: An alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **82**:249-253.

Saíd-Fernández, S., Mata-Cárdenas, B.D., González-Garza, M.T., Navarro-Marmolejo, L., Rodríguez-Pérez E., 1993. *Entamoeba histolytica* cyst whit a defective wall formed under axenic condition. Parasitology Research **79**:200-2003.

Saíd-Fernández, S., Mata-Cárdenas, B.D., Castro-Garza, J., Martínez-Rodríguez, H., Navarro-Marmolejo, L., Lozano Garza, G., 1992. Axenic massive cultivation of *Entamoeba histolytica* trophozoites in spinner flasks and in a microfermentor. Archives of Medical Research **23**:57-58.

Savioli, L. Stausfield. S., Bundy D.A.P., Mthel, L.A., Bhatia R., Engels D., Montresor A., Neira M., Shein A. 2002. Schistosomiasis and soil transmitted helmintics infections: forgoins control efforts. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **96**:577-579.

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. Journal of Protozoology **12**:448-459.

Silberman, J.D., Clarck, C.G., Diamond, L.S., Sogin, M. L., 1999. Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small subunit ribosomal RNA genes sequence analysis. Molecular Biology and Evolution **16**:1740-1751.

Snyder, T.L. y Meleney, H.E., 1941. Anaerobiosis and cholesterol as growth requirements of *Endamoeba histolytica*. Journal of Parasitology **29**:278-284.

Spurr A. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Journal of Ultrastructure Research **26**:31-43.

Steel,G. D., Torrie, J.H., Dickey, D.A., 2000. Procedures Statistics Biometrical Approach. Series in probability and statics. 3era ed. McGraw-Hill.

Stoll N.R., 1957. Axenic culture of *E. invadens* in the absence of tissue. Journal of Protozoology **4**:6.

Stone, W., 1935. A method of producing encystment in cultures of *Entamoeba histolytica*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **15**:681-684.

Strickler J.E., Patton C.L., 1975. Adenosine 3'.5'-monophosphate in reproducing and differentiated *Trypanosomas*. Science **190**:1110-1112.

Tellam R.L. Vuocolo T., Jonson S., Jarney J. and Pearson R.D., 2000. Insect chitin synthase: c:DNA sequence, gene organization and expression. European Journal of Biochemistry **267**:6025-6042.

Thepsuparungsikul, V., Seng L., and Bailey G. B., 1971. Differentiation of *Entamoeba*: Encystation of *Entamoeba invadens* in monoxenic and axenic cultures. Journal of Parasitology **57**:1288-1292.

Torian B.E., Reeds S.L., Creely C.M., Coward J.E., Vial K., Stamm W.E., 1990. The 96 kilodalton antigen as an integral membrane protein in pathogenic *Entamoeba histolytica*: potential differences in pathogenic and non pathogenic isolates. Infection and Immunity **58**:753-760.

Valdéz-Aguirre A., Villarreal-Treviño L, Vargas-Villarreal J., Mata-Cárdenas B.D., Morales-Vallarta M., 2000. Effect of agents that modified cAMP levels on growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. Archives of Medical Research **31**:S198-S199.

Van Dellen K.J., Bulik D.A.S., Specht C.A., Robbins P.W., Samuelson J.C., 2006. Heterologous expression of an *Entamoeba histolytica* chitin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukariotic Cell **5**:203-206.

Vaidya, A.B., and D.K. Ray. 1982. Amoebiasis: the tropical source. Science Today India, p.21-26.

Verna, K.K., Raizada M.K., Krishna-Murti C.R., 1974. Effect of bioamines on the cellular differentiation of *Hartmanella culbertsoni*. Biochemistry Pharmacology **23**:57-59.

Villarreal-Treviño, L. 1990. Nuevo método de enquistamiento axénico de *Entamoeba invadens* e inducción de cuerpos cromatoides en fase activa de crecimiento. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL., Monterrey, N.L.

Walker E.L. and Sellards A.W., 1913. Experimental entamoebic dysentery. Tropical Medicine and Parasitology **8**:253-330.

www.centerdiseasescontrol.com

Zuckrman, L. y Meleney, H., 1945. A fluid medium for the encystations of *Entamoeba histolytica* under reduced atmospheric pressure. Journal of Parasitology **31**:155-157.

TABLA B. (Continúa).

| | 0.0 | 0.001 | 0.002 | 0.003 | 0.004 | 0.005 | 0.006 | 0.007 | 0.008 | 0.009 |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 0.90 | 6.28173 | 6.28748 | 6.29322 | 6.29902 | 6.30488 | 6.31071 | 6.31672 | 6.32271 | 6.32875 | 6.33482 |
| 0.91 | 6.34097 | 6.34716 | 6.35339 | 6.35969 | 6.36603 | 6.37243 | 6.37889 | 6.38541 | 6.39199 | 6.39862 |
| 0.92 | 6.40536 | 6.41207 | 6.41881 | 6.42558 | 6.43236 | 6.43919 | 6.44607 | 6.45298 | 6.45991 | 6.46687 |
| 0.93 | 6.47080 | 6.47835 | 6.48591 | 6.49348 | 6.50106 | 6.50865 | 6.51625 | 6.52387 | 6.53150 | 6.53915 |
| 0.94 | 6.54521 | 6.55405 | 6.56290 | 6.57176 | 6.58063 | 6.58951 | 6.59840 | 6.60730 | 6.61621 | 6.62512 |
| 0.95 | 6.63404 | 6.64399 | 6.65395 | 6.66392 | 6.67390 | 6.68388 | 6.69387 | 6.70386 | 6.71385 | 6.72384 |
| 0.96 | 6.73383 | 6.74482 | 6.75581 | 6.76680 | 6.77779 | 6.78878 | 6.79977 | 6.81076 | 6.82175 | 6.83274 |
| 0.97 | 6.84373 | 6.85572 | 6.86771 | 6.87970 | 6.89169 | 6.90368 | 6.91567 | 6.92766 | 6.93965 | 6.95164 |
| 0.98 | 6.96363 | 6.97662 | 6.98961 | 7.00260 | 7.01559 | 7.02858 | 7.04157 | 7.05456 | 7.06755 | 7.08054 |
| 0.981 | 7.09353 | 7.10652 | 7.11951 | 7.13250 | 7.14549 | 7.15848 | 7.17147 | 7.18446 | 7.19745 | 7.21044 |
| 0.982 | 7.22343 | 7.23642 | 7.24941 | 7.26240 | 7.27539 | 7.28838 | 7.30137 | 7.31436 | 7.32735 | 7.34034 |
| 0.983 | 7.35333 | 7.36632 | 7.37931 | 7.39230 | 7.40529 | 7.41828 | 7.43127 | 7.44426 | 7.45725 | 7.47024 |
| 0.984 | 7.48023 | 7.49322 | 7.50621 | 7.51920 | 7.53219 | 7.54518 | 7.55817 | 7.57116 | 7.58415 | 7.59714 |
| 0.985 | 7.61013 | 7.62312 | 7.63611 | 7.64910 | 7.66209 | 7.67508 | 7.68807 | 7.70106 | 7.71405 | 7.72704 |
| 0.986 | 7.73703 | 7.75002 | 7.76301 | 7.77600 | 7.78899 | 7.80198 | 7.81497 | 7.82796 | 7.84095 | 7.85394 |
| 0.987 | 7.86693 | 7.87992 | 7.89291 | 7.90590 | 7.91889 | 7.93188 | 7.94487 | 7.95786 | 7.97085 | 7.98384 |
| 0.988 | 7.99683 | 8.00982 | 8.02281 | 8.03580 | 8.04879 | 8.06178 | 8.07477 | 8.08776 | 8.10075 | 8.11374 |
| 0.989 | 8.12673 | 8.13972 | 8.15271 | 8.16570 | 8.17869 | 8.19168 | 8.20467 | 8.21766 | 8.23065 | 8.24364 |
| 0.990 | 8.25663 | 8.26962 | 8.28261 | 8.29560 | 8.30859 | 8.32158 | 8.33457 | 8.34756 | 8.36055 | 8.37354 |
| 0.991 | 8.38653 | 8.39952 | 8.41251 | 8.42550 | 8.43849 | 8.45148 | 8.46447 | 8.47746 | 8.49045 | 8.50344 |
| 0.992 | 8.51643 | 8.52942 | 8.54241 | 8.55540 | 8.56839 | 8.58138 | 8.59437 | 8.60736 | 8.62035 | 8.63334 |
| 0.993 | 8.64633 | 8.65932 | 8.67231 | 8.68530 | 8.69829 | 8.71128 | 8.72427 | 8.73726 | 8.75025 | 8.76324 |
| 0.994 | 8.77613 | 8.78912 | 8.80211 | 8.81510 | 8.82809 | 8.84108 | 8.85407 | 8.86706 | 8.88005 | 8.89304 |
| 0.995 | 8.90303 | 8.91602 | 8.92901 | 8.94200 | 8.95499 | 8.96798 | 8.98097 | 8.99396 | 9.00695 | 9.01994 |
| 0.996 | 9.03183 | 9.04482 | 9.05781 | 9.07080 | 9.08379 | 9.09678 | 9.10977 | 9.12276 | 9.13575 | 9.14874 |
| 0.997 | 9.16163 | 9.17462 | 9.18761 | 9.20060 | 9.21359 | 9.22658 | 9.23957 | 9.25256 | 9.26555 | 9.27854 |
| 0.998 | 9.29133 | 9.30432 | 9.31731 | 9.33030 | 9.34329 | 9.35628 | 9.36927 | 9.38226 | 9.39525 | 9.40824 |
| 0.999 | 9.42103 | 9.43402 | 9.44701 | 9.46000 | 9.47299 | 9.48598 | 9.49897 | 9.51196 | 9.52495 | 9.53794 |

Anexo - B

ECUACIONES

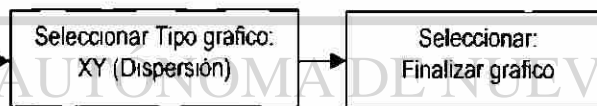
Durante el desarrollo de este trabajo determinamos la CI_{50} de los siguientes agentes químicos: cafeína, teofilina, NaF, extracto metanólico de *Castela texana* y metronidazol. En esta sección se muestra el procedimiento para determinar la CI_{50} del extracto metanólico de *Castela texana* sobre un cultivo axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. Los pasos son los siguientes:

- 1.- Preparar la solución madre a una concentración de 0.01g/mL.
- 2.- Evaluar sobre el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica*, cultivado a 37°C/ 72 h las concentraciones de 0.5mg/mL, 0.35 mg/mL y 15 mg/mL.
Nota. Preparar en total 3 ensayos por triplicado para cada concentración y para el control.
- 3.- Determinar el número de cel/mL de cada tubo y obtener el promedio.
- 4.- Vaciar los datos a la siguiente tabla.

| Dosis a evaluar mg/mL | Log de la Dosis | Células vivas (control) | Células muertas | Células Muertas / vivas | PROBIT |
|-----------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|---------|
| Control | | 68,958 | 0 | - | - |
| 0.50 | -0.301 | 1250 | 67292 | 0.9758 | 6.96039 |
| 0.35 | -0.4559 | 30,000 | 38958 | 0.5649 | 5.16079 |
| 0.15 | -0.8239 | 48125 | 20833 | 0.3021 | 4.48174 |

- 5.- Graficar Log. de la Dosis a evaluar / valor PROBIT, en el siguiente orden.

| Log Dosis | valor Probit |
|-----------|--------------|
| -0.301 | 6.96 |
| -0.4559 | 5.27 |
| -0.8239 | 4.48 |

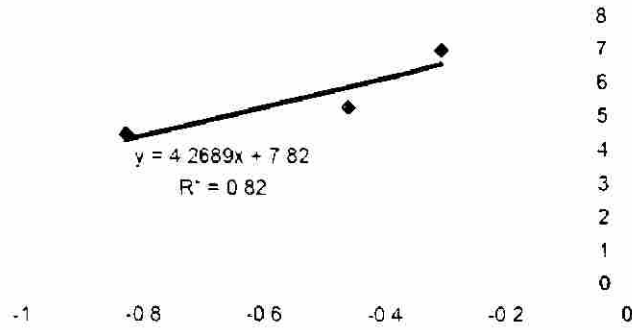


Una vez graficado, colocar el cursor en uno de los puntos y oprimir el lado derecho del ratón.

Se desplegarán una serie de datos, de estos seleccionar en el siguiente orden

- a) Agregar línea de tendencia
- b) Lineal
- c) Opciones: Presentar ecuación en el grafico y Presentar valor de R^2 en el grafico
- d) Aceptar

6 -Se obtendra la siguiente grafica con los valores de Y y la R²



7 - Despejar de la ecuacion $y = 1.4449X + 6.098$ el valor de X, en el entendido de que y 5, y sustituirlo en la ecuacion

8 - $5 = 4.2689 X + 7.82$

9 - Despejar X

10 - $X = \frac{5 - 7.82}{4.2689}$

11 - (-0.6605)

12 - Antilog (-0.6605)

13 - 0.218

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por lo tanto se requieren 0.218 mg/mL del extracto metanolico de *Castela texana* para matar al 50% de la poblacion de *Entamoeba histolytica* cultivada bajo condiciones axenicas en el medio FYI-S-33

Anexo - C

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook 1

Normality Test: Failed ($P < 0.050$)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in Notebook 1

| Group | N | Missing | Median | 25% | 75% |
|--------------------|---|---------|--------|--------|--------|
| Control | 3 | 0 | 96 000 | 95 250 | 97 500 |
| Calcofluor M2r | 3 | 0 | 37 000 | 28 750 | 49 600 |
| Metronidazol | 3 | 0 | 35 000 | 32 000 | 38 000 |
| NaF | 3 | 0 | 58 000 | 45 925 | 70 000 |
| Cafeina | 3 | 0 | 64 000 | 59 500 | 65 950 |
| Teofilina | 3 | 0 | 64 100 | 60 950 | 67 025 |
| EM <i>C.texana</i> | 3 | 0 | 54 200 | 51 650 | 56.300 |

H = 18.782 with 7 degrees of freedom ($P = 0.009$)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance, there is a statistically significant difference ($P = 0.009$)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)

| Comparison | Diff of Ranks | q | P<0.05 |
|-------------------------------|---------------|-------|-------------|
| Control vs Metronidazol | 59 000 | 4 817 | Yes |
| Control vs Calcofluor M2r | 56 000 | 4 572 | Yes |
| Control vs EM <i>C.texana</i> | 43 000 | 3 511 | Yes |
| Control vs NaF | 30 000 | 2 449 | Do Not Test |
| Control vs Cafeina | 23 000 | 1 878 | Do Not Test |
| Control vs Teofilina | 18 000 | 1 470 | Do Not Test |
| Teofilina vs Metronidazol | 41 000 | 3 348 | No |

| | | | |
|---------------------------------------|--------|-------|-------------|
| Teofilina vs Calcofluor M2r | 38 000 | 3.103 | Do Not Test |
| Teofilina vs EM <i>C. texana</i> | 25 000 | 2.041 | Do Not Test |
| Teofilina vs NaF | 12 000 | 0.980 | Do Not Test |
| Teofilina vs Cafeina | 5 000 | 0.408 | Do Not Test |
| Teofilina vs Cafeina | 5.000 | 0.408 | Do Not Test |
| Cafeina vs Metronidazol | 36 000 | 2.939 | Do Not Test |
| Cafeina vs Calcofluor M2r | 33 000 | 2.694 | Do Not Test |
| Cafeina vs EM <i>C. texana</i> | 20 000 | 1.633 | Do Not Test |
| Cafeina vs NaF | 7 000 | 0.572 | Do Not Test |
| Cafeina vs Cafeina | 0 000 | 0.000 | Do Not Test |
| Cafeina vs Metronidazol | 36 000 | 2.939 | Do Not Test |
| Cafeina vs Calcofluor M2r | 33 000 | 2.694 | Do Not Test |
| Cafeina vs EM <i>C. texana</i> | 20 000 | 1.633 | Do Not Test |
| Cafeina vs NaF | 7 000 | 0.572 | Do Not Test |
| NaF vs Metronidazol | 29 000 | 2.368 | Do Not Test |
| NaF vs Calcofluor M2r | 26 000 | 2.123 | Do Not Test |
| NaF vs EM <i>C. texana</i> | 13.000 | 1.061 | Do Not Test |
| EM <i>C. texana</i> vs Metronidazol | 16 000 | 1.306 | Do Not Test |
| EM <i>C. texana</i> vs Calcofluor M2r | 13 000 | 1.061 | Do Not Test |
| Calcofluor M2r vs Metronidazol | 3 000 | 0.245 | Do Not Test |

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between the two rank sums that enclose that comparison. For example, if you had four rank sums sorted in order, and found no significant difference between rank sums 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed rank sums is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the rank sums, even though one may appear to exist.

GLOSARIO

Absceso hepático amibiano: El absceso hepático amebiano es una acumulación de pus en el hígado causada por el parásito intestinal *Entamoeba histolytica*. Es la complicación extraintestinal más común de la amebiasis. La mayoría de los pacientes presentan un cuadro agudo de menos de 10 días de fiebre y dolor abdominal. El síntoma más común es un dolor sordo en el cuadrante superior derecho que se puede irradiar al hombro. También puede haber dolor epigástrico o pleurítico. Una hepatomegalia con dolor es el signo más sugestivo pero no es diagnóstico. La mayoría de los pacientes tienen fiebre. Aunque todos los pacientes hayan tenido infección intestinal antes del desarrollo del absceso, menos del 30% tienen diarrea al momento de presentar las manifestaciones del absceso hepático. Una minoría de pacientes pueden presentar un curso crónico con síntomas subagudo por más de dos semanas. Estos más probablemente mostrarán una enfermedad emaciante con hepatomegalia, pérdida de peso, y anemia. Las presentaciones atípicas pueden incluir falta de aliento, tos secundaria a efusión pleural, o a ruptura de absceso en el espacio pleural. Los hallazgos de laboratorio asociados con el absceso hepático amebiano incluyen leucocitosis sin eosinofilia, anemia moderada en más de la mitad de los casos, niveles elevados de fosfatasa alcalina en el 80% de los casos, transaminasas elevadas en los casos severos y velocidad de eritrosedimentación aumentada.

Acetil-coenzima-A: El acetil-CoA es el producto común de la degradación de los principales combustibles metabólicos (polisacáridos, lípidos y proteínas). El grupo acetilo es degradado a CO_2 y H_2O vía el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa o utilizado para la síntesis de ácidos grasos. El Acetil-CoA (AC-CoA) es el producto común del metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. El Ac-CoA es un compuesto de alta energía. El ΔG para la hidrólisis de su enlace tioéster es de $-31.5 \text{ kJ mol}^{-1}$, lo que hace a la reacción un poco más exergónica que la hidrólisis del ATP ($\approx 1 \text{ kJ mol}^{-1}$). El Ac-CoA es sintetizado a partir de piruvato a través de una descarboxilación oxidativa catalizada por el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa (PDH).

Actina: (del griego *aktis* rayo) Proteína compuesta por subunidades globulares que forma microfilamentos, uno de los tres componentes fundamentales del citoesqueleto de las células eucariotas. Se expresa en todas las células del cuerpo y especialmente en las musculares ya que está implicada en la contracción muscular, por interacción con la miosina. Puede encontrarse en forma libre o polimerizarse en microfilamentos, que son esenciales para funciones celulares tan importantes como la movilidad y la contracción de la célula durante la división celular.

Adenina: Es una de las cinco bases nitrogenadas que forman parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y en el código genético se representa con la letra A. En el ADN la adenina siempre se empareja con la timina. Forma los nucleosidos adenosina (Ado) y desoxiadenosina (dAdo), y los nucleótidos adenilato (AMP) y desoxiadenilato (dAMP).

Su fórmula es $C_5H_5N_5$. Es un derivado de la purina (es una base purica) en la que un hidrogeno ha sido sustituido por un grupo amino (NH_2). La adenina, junto con la timina, fue descubierta en 1885 por el bioquímico alemán Albrecht Kossel.

Adenosil Monofosfato cíclico: molécula formada por un nucleótido que sirve de señal entre el receptor postsináptico y el canal por el que se mueven los iones, que a su vez cambian el estado eléctrico de la neurona.

Adherencia celular: Unión que presentan las células entre sí o para fijarse al sustrato. La adherencia celular requiere la presencia en la membrana celular de proteínas específicas para la unión, que a menudo se asocian entre sí formando complejos de unión proteica entre sí o para fijarse al sustrato. La adherencia celular requiere la presencia de proteínas específicas para la unión, que a menudo se asocian entre sí formando complejos de unión proteica. Unión que presentan las células entre sí o para fijarse al sustrato. La adherencia celular requiere la presencia en la membrana celular de proteínas específicas para la unión, que a menudo se asocian entre sí formando complejos de unión proteica.

ADN (ácido desoxirribonucleico): Un ácido nucleico compuesto de dos cadenas polinucleotídicas que se disponen alrededor de un eje central formando una doble hélice, capaz de autorreplicarse y codificar la síntesis de ARN. Lugar donde está "depositada" la información genética. Ácido nucleico que funciona como soporte físico de la herencia en el 99% de las especies. La molécula, bicatenaria, está formada por dos cadenas antiparalelas y complementarias entre sí. Su unidad básica, el nucleótido, consiste en una molécula del azúcar desoxirribosa, un grupo fosfato, y una de estas cuatro bases nitrogenadas: adenina, timina, citosina y guanina.

Ameba: Protozoo rizópodo unicelular que se caracteriza por su forma cambiante, puesto que carece de pared celular, y por su movimiento ameboide a base de pseudópodos, que también usa para capturar alimentos. Unas especies viven libres en agua o tierra, y otras en el intestino del hombre o de los animales.

Amebaporo: Esta proteína está formada por 4 hélices alfa y existen 3 isoformas denominadas A, B, y C, de las cuales la C es la más activa. Forma canales que permiten el paso de iones, agua y moléculas pequeñas, lo cual altera el equilibrio osmótico de la célula y lleva a su lisis. Ejercen actividad histolítica *in vitro* contra varias líneas celulares humanas y se localizan en vesículas citoplasmáticas del trofozoito de *E. histolytica*. No se ha demostrado que sean secretadas por los trofozoítos, así que su actividad es intracelular para digerir las células previamente fagocitadas. Su estructura es muy similar a la de otras proteínas porinas.

Ameboma: Es una presentación inusual de la amibiasis intestinal que ocurre en menos del 1% de los pacientes con enfermedad invasora intestinal. La mayoría de los pacientes presentan una masa intestinal que puede presentar dolor a la palpación. En la radiografía el ameboma se confunde con un carcinoma de colon. Una prueba serológica o una biopsia evitarían una cirugía innecesaria.

Amibiasis: La amibiasis o amebiasis es una infección ocasionada por un parásito protozario unicelular llamado *Entamoeba histolytica*.

Anaerobio facultativo: Es un ser vivo, que crece tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

ATP (adenosín trifosfato): El principal producto químico utilizado por los sistemas vivientes para almacenar energía, consiste en una base (adenina) unida a un azúcar (ribosa) y a tres fosfatos.

Bases nitrogenadas: Son compuestos orgánicos cíclicos, que incluyen dos o más átomos de nitrógeno. Son parte fundamental de los nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos. Biológicamente existen cinco bases nitrogenadas principales, que se clasifican en dos grupos, bases púricas (derivadas de la estructura de la purina) y bases pirimidínicas (derivadas de la estructura de la pirimidina). La adenina (A) y la guanina (G) son púricas, mientras que la timina (T), la citosina (C) y el uracilo (U) son pirimidínicas. Las cuatro primeras bases se encuentran en el ADN, mientras que en el ARN en lugar de timina existe el uracilo. Las bases nitrogenadas son complementarias, lo cual constituye la clave de la estructura del ADN y tiene importantes implicaciones, pues permite procesos como la replicación del ADN y la traducción del ARN en proteínas.

Bilis. Es una sustancia líquida alcalina amarillenta producida por el hígado de muchos vertebrados. Interviene en los procesos de digestión funcionando como emulsionante de los ácidos grasos. Su secreción es continua, por lo que en los periodos interdigestivos se almacena en la vesícula biliar, y se libera al duodeno tras la ingesta de alimentos. La composición de la bilis es la siguiente: líquido ácido, neutro o ligeramente alcalino, formado por sales biliares, proteínas, colesterol, hormonas y enzimas.

Cafeína La cafeína es un alcaloide de la familia metilxantina, que también incluye los compuestos teofilina y teobromina, con estructura química similar. En estado puro es un polvo blanco muy amargo. Fue descubierta en 1819 por Ruge y descrita en 1821 por Pelletier y Robiquet. Su fórmula química es $C_8H_{10}N_4O_2$, su nombre sistemático es 1,3,7-trimetilxantina o 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona.

La **cafeína** es un compuesto alcaloide (del grupo de las xantinas) que actúa como estimulante en los humanos. La cafeína se encuentra principalmente en los frutos de la planta de café, en la planta de té, en la yerba mate, y en las bayas de guaraná. En pequeñas cantidades se puede encontrar en el cacao y en la nuez de kola. En general, la cafeína se encuentra en las semillas, hojas, y frutos de más de 60 plantas, en las que actúa como un pesticida natural que paraliza y mata ciertas clases de insectos cuando se alimentan de éstas.

Centrifugación diferencial: Es el método más común de separación, y es rara la purificación enzimática que no lo utiliza. En este método, el tubo de centrifuga se llena con una mezcla uniforme problema. Tras la centrifugación se obtienen dos fracciones: un pellet que contiene el material sedimentado y un sobrenadante con el material no sedimentado. El método es bastante inespecífico, y a priori no se puede saber si la partícula buscada quedará en el sobrenadante, en el pellet o repartido entre ambos; sin embargo es una técnica muy útil, sobre todo para aislamiento de células y orgánulos subcelulares.

Citoesqueleto: Entramado tridimensional de microtúbulos y filamentos que proveen el soporte interno para las células, anclan las estructuras internas de la misma e interviene en los fenómenos de movimiento celular y en su división.

Colitis aguda: Los pacientes con colitis amibiana aguda usualmente se presentan con una historia de 1 a 2 semanas de dolor abdominal, tenesmo y frecuentes evacuaciones diarreicas con moco y sangre. Pueden agregarse otros síntomas como dolor lumbar y flatulencia. Una minoría de los pacientes presentan fiebre, lo que contrasta con la disentería bacilar, y en algunos la diarrea puede causarles deshidratación. En la mayoría de los casos hay sensibilidad abdominal a la palpación. En la endoscopia se observa la apariencia característica de pequeñas úlceras hemorrágicas con una mucosa normal entre ellas.

Colitis fulminante: Es una complicación inusual de la disentería amibiana que tiene un pronóstico grave, con una mortalidad mayor de 50%. Clínicamente los pacientes se presentan con una diarrea sanguinolenta muy severa y fiebre, seguida de una instalación rápida de dolor abdominal difuso. El progreso puede ser tan rápido que la rigidez abdominal se ha presentado sólo en un 25% de pacientes con perforación intestinal detectada mediante cirugía. Los niños de menor edad tienen más riesgo de presentar colitis fulminante. El desarrollo clínico de la colitis fulminante está asociado con la extensión de las úlceras hasta la serosa.

Cromatina: (del griego chroma = color) Complejo de ADN y proteínas histónicas que en células eucariotas se dispersa en el núcleo durante la interfase y se condensa en cromosomas durante la meiosis y mitosis.

Ectoplasma: Es la region periferica de la célula, carece de granulos y es de mayor densidad que el endoplasma. En contacto directo con la membrana plasmatica. Presenta iones calcio, magnesio y potasio. Presenta microtubulos y microfilamentos que forman el citoesqueleto. Los microfilamentos forman la red terminal. El ectoplasma es de manera gelatinosa y se encuentra debajo de la membrana plasmatica.

Endoplasma: Menos denso que el ectoplasma, se encuentra próximo al nucleo. En el encontramos las siguientes estructuras: mitocondrias, cloroplastos, centriolos, aparato de Golgi, lisosomas, y el reticulo endoplasmatico.

Entamoeba histolytica: Es un parasito anaerobio eucariota protozoo con forma ameboide, dentro del genero Entamoeba. Se pueden distinguir dos principales formas de vida en esta especie: el trofozoito y el quiste.

Enterobacterias: Enterobacteriaceae son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos que fermentan la glucosa en anaerobiosis; citocromo oxidasa negativos; reducen los nitratos a nitritos. Cuando son móviles son flagelados peritricos. Son llamadas enterobacterias porque con frecuencia residen en el aparato digestivo de animales y humanos, pero algunas especies tambien viven en la tierra y en el agua.

Enzima: cualquiera de las numerosas sustancias organicas especializadas compuestas por polimeros de aminoacidos, que actuan como catalizadores en el metabolismo de los seres vivos. Con su accion, regulan la velocidad de muchas reacciones quimicas implicadas en este proceso. El nombre de *enzima*, que fue propuesto en 1867 por el fisiologo aleman Wilhelm Kuhne (1837-1900), deriva de la frase griega *en zymē*, que significa 'en fermento'.

Eucariotas (del griego *eu* – bueno, verdadero, *karyon* – núcleo, nuez): organismos caracterizados por poseer células con un núcleo verdadero rodeado por membrana. El registro arqueológico muestra su presencia en rocas de aproximadamente 1.200 a 1.500 millones de años de antigüedad.

Factores de crecimiento: Los factores de crecimiento son un conjunto de sustancias, la mayoría de naturaleza proteica que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular. La función principal de los factores de crecimiento es la del control externo del ciclo celular, mediante el abandono de la quiescencia celular (G0) y la entrada de la célula en fase G1. La función de los factores de crecimiento no solo es la de estimular la proliferación celular mediante la regulación del ciclo celular iniciando la mitosis, sino también el mantener la supervivencia celular, estimular la migración celular, la diferenciación celular e incluso la apoptosis. Los factores de crecimiento desempeñan su función a muy baja concentración en los líquidos corporales, del orden de los picogramos. Actúan uniéndose a receptores celulares situados en la membrana celular que transmiten la señal del exterior al interior de la célula, mediante el acoplamiento de diferentes proteinquinas que se fosforilan y que activan una cascada de señales que acaba con la activación de uno o varios genes (transducción de señales).

Fagocitosis: La fagocitosis es la acción de envolver microorganismos, partículas extrañas, restos celulares por células como los neutrófilos y macrófagos (monocitoplasmas). Este es un mecanismo de defensa muy importante, particularmente en infecciones bacterianas. Los neutrófilos y los monocitoplasmas, están equipados con mecanismos dependientes e independientes de Oxígeno para matar a las bacterias. Los mecanismos dependientes de Oxígeno, incluyen el sistema de mieloperoxidasa (MPO) y otros sistemas que involucran la generación de radicales libres derivados del Oxígeno. Los mecanismos independientes de Oxígeno, utilizan cambios de pH en los fagosomas y lisosomas para destruir a los patógenos. En conjunto el MPO es el más potente antibacteriano celular. Después de la fagocitosis, la NADPH oxidasa localizada en la membrana del leucocito convierte el oxígeno molecular en el radical superóxido. El rápido consumo de oxígeno molecular que acompaña la formación del superóxido se denomina "explosión respiratoria". Después el superóxido es transformado en peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa.

Fagocito (del griego *phagos* = comilon, *kytos* = célula): literalmente "célula comilona" deriv **fagocitosis**, forma de endocitosis en la cual la célula rodea a partículas sólidas, bacterias o virus que son introducidas para su destrucción.

Fluorescencia: Es la propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a radiaciones del tipo ultravioleta, rayos catódicos o rayos X. Las radiaciones absorbidas (invisibles al ojo humano), son transformadas en luz visible, o sea, de una longitud de onda mayor a la incidente. En el proceso, una molécula absorbe un fotón de alta energía, el cual es emitido como un fotón de baja energía (mayor longitud de onda). La diferencia de energía entre la absorción y la emisión, es disipada como calor (vibraciones moleculares). Todo el proceso es muy corto (millonesimas de segundo) y este tiempo es la principal diferencia con otro conocido fenómeno luminoso, la fosforescencia.

Galactosa: La lactosa es un disacárido formado por glucosa y galactosa. La idea original fue que en ese tejido la glucosa debía ser un precursor de la galactosa. Con las técnicas de esa época y siendo la glándula mamaria un tejido complejo, los primeros resultados fueron confusos. El Dr. Leloir buscando simplificar el problema utilizó células de levadura común cultivadas en presencia de galactosa. De esta forma pudieron en poco tiempo aislar dos nuevas coenzimas, una estable al calor y otra sensible. La primera de ellas resultó ser glucosa 1,6 difosfato, que actúa como coenzima de una importante etapa de la glucólisis catalizada por la fosfoglucomutasa.

Glucógeno: El glucógeno, reserva de glucosa en los animales, se almacena principalmente en hígado y músculo. Su conversión a glucosa-6-fosfato (G6P) para entrar a la glucólisis, es catalizada en parte por la glucógeno fosforilasa, el camino inverso *i.e.* la síntesis, se lleva a cabo por la glucógeno sintasa. Estas enzimas están reguladas reciprocamente a través de reacciones de fosforilación/defosforilación, este proceso es el resultado de una cascada de fosforilación que responde a los niveles de glucagón y epinefrina a través del CAMP. El glucógeno representa la principal forma de almacenamiento de carbohidratos tanto en animales como en las plantas. Cuando existe una disminución significativa de glucosa en sangre, el glucógeno es degradado.

por medio de una serie de enzimas para cubrir las necesidades energéticas de nuestro organismo. Las glucogenosis son enfermedades en donde existen deficiencias congénitas de la mayoría de las enzimas relacionadas con el metabolismo del glucógeno, en donde los órganos más afectados son el hígado y el músculo esquelético.

Glucosa: Molécula ($C_6H_{12}O_6$) es una aldohexosa (aldehído pentahidroxilado) y un monosacárido. La glucosa es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza. Es la fuente principal de energía de las células, mediante la degradación catabólica, y es el componente principal de polímeros de importancia estructural como la celulosa y de polímeros de almacenamiento energético como el almidón, es encontrada en las frutas y en la miel.

Glutaraldehído: Fue descubierto por David Domingo Sabatini, científico y médico argentino, quien encontró que esta sustancia se encarga de preservar las células, posibilitando su análisis en el microscopio un mayor lapso de tiempo.

Microtúbulos (del latín *mikros* = pequeño, *tubus* = caño, conducto) Conducto hueco, estrecho y alargado de unos 25 nm de diámetro. Se compone de dos subunidades de proteínas que se alternan a lo largo del mismo, y, entre otras funciones, mueven a los cromosomas en la división celular y proporcionan la estructura interna de cilios y flagelos.

Organelos (del griego *organon* = herramienta). Estructuras subcelulares que realizan determinadas funciones (generalmente están rodeadas por membranas y se las encuentra en las células eucariotas) p.ej., mitocondrias, cloroplastos, núcleo.

Pared celular: Estructura producida por algunas células por fuera de la membrana celular, químicamente compuesta por quitina (hongos), peptidoglicano (bacterias) o celulosas (plantas).

Percoll: Se trata de una suspensión de partículas (5-15 μ m) de ácido silícico revestidas de un derivado de polivinilo (polivinilpirrolidona, PVP) que presenta baja viscosidad a densidades altas, no afecta prácticamente a la presión osmótica del medio y es estable a pH comprendidos entre 5 y 10. Es soluble en solución acuosa y estable en ellas siempre que no haya aniones bivalentes (sulfato), especialmente a bajos pH. Este compuesto es el único útil para la separación de microalgas marinas, ya que el percoll es estable en cualquier proporción de agua marina, a diferencia del resto de los posibles solutos utilizables para la separación de algas por gradiente de densidad. El compuesto puede ser utilizado para centrifugaciones zonales, preformando gradientes, o bien para centrifugación isopícnica, ya que la centrifugación de percoll en rotores angulares durante 20-30 minutos y 20,000-100,000g produce un ligero gradiente, independientemente de la densidad inicial del percoll.

Polímero(del griego *polys* = muchos, *meros* = parte) Molécula compuesta por muchas subunidades idénticas o similares.

Pseudopodos del griego *psuedes* = falso, *podas* = pie.

Purina (del griego *purmos* = centellante, igneo) base nitrogenada formada por dos anillos, la adenina y la guanina son purinas componentes del ADN y el ARN

Quitina (del griego *chiton* – tunica) Es el constituyente esencial de la pared celular de grandes grupos de hongos (basidiomicetos, ascomicetos y zigomicetos) La unidad de la quitina es la N-acetilglucosamina estos monómeros están unidos entre sí igual que la glucosa en la celulosa- mediante uniones β 1,4 glucosídicas También forma esqueleto externo de los artrópodos y otros grupos animales

Quimiósmosis El proceso por el cual se forma el ATP en la membrana interna de la mitocondria El sistema transportador de electrones transfiere protones del compartimento interno al externo, a medida que los protones fluyen nuevamente hacia el compartimento interno la energía del movimiento es usada para agregar fosfato al ADP para formar ATP

Ribosomas: Pequeñas organelas, compuestas de ARNr (r por ribosómico) y proteínas Están presentes en el citoplasma de procariotas (70s) y eucariotas (80s) Son el sitio de la síntesis proteica Esta compuesto de dos subunidades Los ribosomas de las organelas eucariotas (mitocondrias y cloroplastos) tienen 70 S, es decir son similares a los de los procariotas

RNA (ácido ribonucleico) Ácido nucleico formado por una cadena polinucleotídica Su nucleótido, consiste en una molécula del azúcar ribosa, un grupo fosfato y una de estas cuatro bases nitrogenadas adenina, uracilo, citosina y guanina

RNA ribosómico : Uno de los tres tipos de ARN el ARNr es un componente estructural de los ribosomas Son el "core" (parte principal) de los ribosomas y posiblemente la clave del mecanismo de traducción de las proteínas Su estudio comparativo llevó a postulación de un Arbol Filogenético Universal

Simbiosis (del griego *syn* junto, con, *biosis* vivir) Asociación entre dos o más organismos de diferentes especies Incluye 1) mutualismo donde la asociación es beneficiosa para ambos 2) comensalismo donde uno se beneficia y el otro no es dañado ni beneficiado 3) parasitismo uno se beneficia y el otro es dañado

Vacuolas (del latín *vacuus* = vacío) espacio o cavidad citoplasmática, rodeada por una membrana, que se observa en células animales y vegetales que remueven productos de desechos y almacenan alimentos ingeridos Parte de los compartimentos lisosómicos de la célula

Vesícula (del latín *vesicula* = pequeña vasija) pequeño saco intracelular rodeado por una membrana



la mitad de la fase log). El proceso de enquistamiento ha sido muy poco estudiado debido a la dificultad para inducirlo ya que desde finales del siglo XIX una serie de estudiosos de la amibiasis han intentado reproducir en forma masiva el ciclo de vida de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas, sin embargo hasta ahora no se ha reportado algún medio o método en el cual hayan logrado completar el ciclo de vida axénico *in vitro* de *E. histolytica*.

Los antecedentes que se tienen acerca de las características típicas de los quistes de *E. histolytica* son de muestras que se han obtenido de heces diarreicas ya que la mayoría de los autores refieren que estas muestras proceden de pacientes con disentería amibiana y en el curso de esta sintomatología las heces son diarreicas lo cual hace sospechar que aíslan sólo prequistes que no llegan a madurar a nivel de la luz del colon descendente de los pacientes debido a que son arrojados de una forma muy “violenta”. Este hecho puede dar origen a reportes falsos negativos, debido a que en las heces diarreicas será muy poco probable la presencia de quistes maduros tetranucleados e impactar directamente en los reportes epidemiológicos. Sin embargo existen pacientes infectados en los cuales no existe sintomatología alguna de la presencia de *E. histolytica* más que el análisis seriado de muestras fecales formadas y pastosas, que es en donde se llegan a encontrar quistes maduros tetranucleados, sin embargo considero que hace falta un estudio minucioso y detallado acerca de la morfología y fisiología de los quistes y del enquistamiento, para dar un seguimiento a detalle de cuales son aquellos quistes que se consideran o son realmente maduros e infectivos, cuanto tiempo resiste en el ambiente y del proceso de desenquistamiento, ya que los estudios que existen datan del siglo antepasado y mediados del siglo XX.

El análisis de las estructuras semejantes a quistes por microscopía electrónica de transmisión (MET) mostraron núcleos en diferentes etapas durante el proceso de diferenciación el cual ocurrió en presencia de alta tensión de CO₂, en estos cortes se observaron distintas posibles fases de la mitosis, como se ha observado en *Entamoeba invadens* (Morales *et al.*, 1989); la pared celular se observa delgada y las estructuras semejantes a quistes se observan regularmente esféricas, sin embargo está no es meramente una característica típica de un quiste obtenido de muestras de pacientes (Proctor y Gregory, 1973), en las muestras que ellos reportan se observan quistes con morfología no siempre esférica, como se observa en la figura 43.

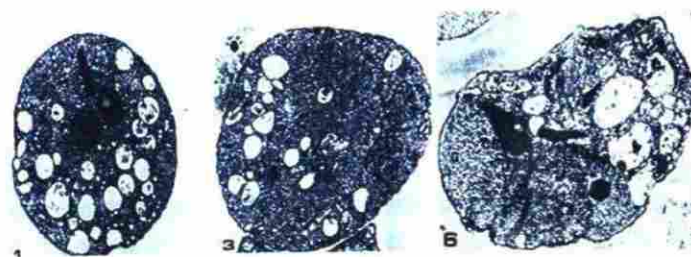


Figura 45. Morfología diversa de quistes de *E. histolytica*. Imágenes reportada por Proctor y Gregory, que muestra que los quistes de *E. histolytica* obtenidos *in vivo* no siempre son esféricos, tal como se les describe en la literatura

En cortes al MET de quistes obtenidos a partir de muestras de pacientes (Chávez *et al.*, 1978) se observa que la pared celular es más gruesa que la pared que presentan las estructuras semejantes a quistes encontradas en este trabajo; sin embargo la distribución vesicular es muy semejante como se observa en la figura 46.

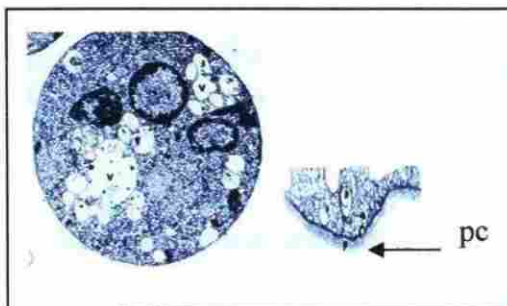


Figura 46. Quiste y pared celular de *E. histolytica*. Imagen reportada por Chávez, 1978.

Por otra parte las estructuras semejantes a quistes obtenidas *in vitro* con la metodología reportada en este trabajo no mostraron cuerpos cromatoides sólo escasas hélices de ribonucleoproteínas en trofozoítos prequísticos de *E. histolytica* al día 3 de encontrarse en incubación a 37°C bajo alta tensión de CO₂ en el medio TYI-S-33 (Figs. 21 y 22), sin embargo en un experimento preliminar realizado en este laboratorio por el Dr. Mario R. Morales V. en cultivos de *E. histolytica* empleando el medio PEHPS y cultivados bajo las mismas condiciones se encontró la presencia de cuerpos cromatoides muy escasos; sin embargo la presencia de estas estructuras en quistes maduros de *E. histolytica* es incierta ya que en tinciones de quistes de este parásito los mismos autores tienen discrepancia en la presencia de estos cuerpos cromatoides en quistes maduros, tal como lo señalan los siguientes autores:

“Los quistes jóvenes poseen 1 ó 2 núcleos, algunos cuerpos cromatinicos y vacuolas de glucógeno. Cuando el quiste madura, posee cuatro núcleos y desaparecen los cuerpos cromatinicos. Solo los quiste maduros son infecciosos” (Pumarola *et al.*, 1987).

“Los quistes son esféricos, miden entre 10 y 16 μ m de diámetro, poseen una pared de aproximadamente 0,5 μ m y contienen habitualmente 4 núcleos cuando están maduros. Los quistes jóvenes poseen además vacuolas con glucógeno y cuerpos cromatoides que disminuyen durante la maduración” (Perez *et al.*, 2002).

“Los quistes son formas redondas o ligeramente ovaladas de 8 a 20 μ m de diámetro, las cuales, en muestras sin teñir, se pueden ver como cuerpos hialinos con pared refringente. Su citoplasma es incoloro permitiendo la visualización de los llamados cuerpos cromatoides y núcleos en número de uno a cuatro (Martínez, 1982).

Sin embargo, a la fecha no existen trabajos detallados para descartar o confirmar estas afirmaciones, como podría ser el completar el ciclo de vida de *E. histolytica* a partir de quistes con o sin presencia de cuerpos cromatoides, que confirmen o descarten a que se le puede considerar como “quiste maduro” o “quiste infeccioso”.

Empleando inhibidores de síntesis de proteínas en trofozoítos reportan la presencia de hélices de ribonucleoproteínas o de cuerpos cromatoides, en quistes de *Entamoeba invadens*, por lo que concluyeron que la formación de las hélices de ribonucleoproteínas o cuerpos cromatoides inducidos por inhibidores de la síntesis de proteínas es un proceso espontáneo en el que los ribosomas “ociosos” provenientes de polisomas se agregan espontáneamente de forma cristalina (Kusamrarn *et al.*, 1975). Sin embargo aún en *E. invadens* existen discrepancias si los quistes inducidos *in vitro*, los cuales como característica esencial deben presentar cuerpos cromatoides son en realidad infectivos, debido a que no hay reporte alguno que lo descarte o lo confirme.

Existen una serie de trabajos que sustentan la idea de que los cuerpos cromatoides o hélices de ribonucleoproteínas 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 posterior utilización en una rápida proliferación celular en el subsiguiente proceso de desenquistamiento, aunque este proceso pueda también ser artificialmente inducido por inhibición de la síntesis de proteínas. Esto último es explicable por la aparente capacidad innata de agregación de los ribosomas no asociados a polisomas.

En trabajos previos realizados en *E. invadens* bajo condiciones de alta tensión de CO₂ y condiciones normales (Morales, 1991; Villarreal, 1990; Garibay, 1991 y Acevedo, 1993) se ha reportado la presencia de cuerpos cromatoides en trofozoítos en fase-log crecidos con alta tensión de CO₂, lo cual indica que las células se encontraban en crecimiento activo pero esta idea se contrapone con la suposición de que los cuerpos cromatoides sólo se encuentran en células de cultivo envejecido, o en células que se preparan para entrar en diferenciación (Barker y Deutsch, 1958).

Por otra parte los resultados del análisis de proteínas totales mediante electroforesis muestran mayor número de bandas en las estructuras semejantes a quistes que en trofozoítos (Fig. 36). Estos cambios en los patrones electroforéticos, de proteínas se presentan también en procesos de patogenicidad y diferenciación en los protozoarios parásitos; se ha observado que durante etapas tempranas del proceso de enquistamiento en *Trypanosoma cruzi* el proceso de transcripción de la ubiquitina desaparece, seguido por un incremento en los niveles de ubiquitina, (Algranati *et al.*, 2006). Eventos similares se han observado también en *E. invadens* (González *et al.*, 1999), por lo que es posible que estos mecanismos de regulación de degradación de proteínas jueguen también un papel importante en el proceso de diferenciación de *Entamoeba histolytica* (Algranati *et al.*, 2006). Si bien los resultados obtenidos en este trabajo no muestran evidencia en que tipo de proteínas aparecen o desaparecen durante el enquistamiento, sí nos habla de notables cambios en el contenido proteico durante este proceso, cambios que serán objetivo de trabajos futuros así como el análisis comparativo entre los trofozoítos, estructuras semejantes a quistes y quistes obtenidos de pacientes con amibiasis.

Al cuantificar los niveles de RNA total tanto en trofozoítos como en las estructuras semejantes a quistes se observó 6.9 veces mayor cantidad en los trofozoítos que en las estructuras semejantes a quistes (Figs. 37 y 38), estos resultados pueden deberse a

que la técnica aquí empleada para la purificación del RNA total (Técnica de Trizol[®]) no fue la adecuada para aislar RNA total a partir de las estructuras semejantes a quistes, dado que la cubierta de quitina posiblemente es resistente a los ácidos y no fue suficiente el tiempo de acción del Trizol[®] para romper la cubierta de quitina de las estructuras semejantes a quistes. Por lo cual sería recomendable realizar una serie de ensayos para evaluar cual es la mejor técnica para extraer el RNA total de las estructuras semejantes a quistes de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.

Las observaciones llevadas a cabo de las estructuras semejantes a quistes a través del microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy) y al microscopio de fuerza atómica, revelan que la topografía es rugosa, formada por una serie de fibrillas que bordean la superficie de ésta estructura quística, el único antecedente gráfico con que se cuenta es la imagen reportada por Martínez, 1987; (Fig. 47) en la cual muestra un agregado de “quistes de *E. histolytica*” vistos al MEB y refiere que fueron aislados a partir de heces fecales de un paciente con amibiasis, sin embargo en mi experiencia personal durante el desarrollo de este trabajo así como experiencia laboral en el área clínica, en las muestras de pacientes sintomáticos o asintomáticos para amibiasis, los quistes siempre se encuentran aislados y nunca en agregados, esta observación ha sido compartida por 7 colegas que trabajan constantemente con muestras de pacientes, por lo que estas observaciones *in vivo* distan de ser iguales a las reportadas por Martínez, 1987; sin embargo *in vitro* se ha observado la formación de estructuras esféricas en agregados al emplear diversos métodos e incluso de forma espontánea al emplear el medio PEHPS o TYI-S-33 para inducir el enquistamiento de *E. histolytica*, esta característica de agregarse también se ha observado durante el enquistamiento *in vitro* en *E. invadens* (Fig. 48), pero no se ha descrito que a partir de muestras *in vivo* presenten esta característica de agregarse.

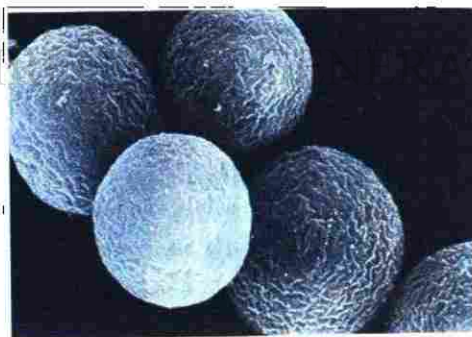


Figura 47. Quistes de *E. histolytica*. Quistes obtenidos de pacientes con amibiasis, imagen reportada por Martínez, 1987.

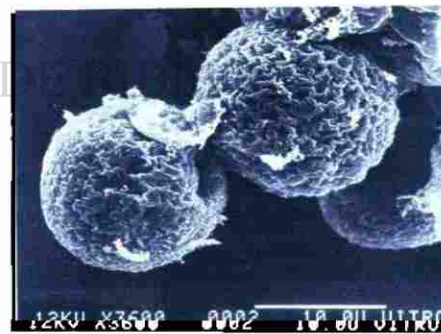


Figura 48. Quistes de *E. invadens*. Quistes obtenidos *in vitro* y reportados por Morales, 1989.

Al microscopio de fuerza atómica, el análisis topográfico de las estructuras semejantes a quistes obtenidos en este trabajo, evidencia que la pared está formada por una cubierta tipo malla o red de quitina y de acuerdo con el análisis topográfico, la altura promedio de la malla es de 800Å, la imagen al microscopio de fuerza atómica es la primera que se reporta para una estructura quística de *Entamoeba histolytica* obtenida *in vitro* bajo condiciones axénicas.

Al tratar de inducir el enquistamiento *in vitro* una serie de investigadores han suplementado los medio de cultivo con suero de diverso origen, sin embargo resulta paradójico estar suplementando a estos trofozoítos con factores de crecimiento que comúnmente se encuentran en el suero, cuando lo que se busca es inhibir su crecimiento para que permita entrar en fase de enquistamiento, ya que evaluando las condiciones *in vivo* a las que se someten los trofozoítos de *E. histolytica* predomina un ambiente denso con condiciones de anaeróbiosis, en donde son escasos los nutrientes como la glucosa, hierro, lípidos o proteínas y cabría el preguntarse ¿Porqué para inducir el enquistamiento *in vitro* suplementamos los medios con suero?, también podríamos replantearnos el papel de las bacterias ácido lácticas en este proceso ya que son parte de la flora normal en individuos sanos. En uno de los diseños experimentales (Tabla VI, bioensayo 18) eliminamos nutrientes del medio TYI-S-33 y sólo dejamos las sales pero obtuvimos resultados pobres; por lo cual cabría la posibilidad de replantearse si los medios empleados hasta ahora son los ideales para inducir el enquistamiento de *E. histolytica*. Al parecer el factor condicionante para inducir el enquistamiento es el CO₂, la escasez de nutrientes y la reducción del medio TYI-S-33 cuyo pH al final fue de 6.1, aunado a la incubación por un lapso de 7 días en el medio TYI-S-33. Asimismo, cabría la posibilidad de realizar más estudios sustituyendo el suero por el PACSR (Mata *et al.*, 1996) para inducir el enquistamiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* ya que en *Entamoeba invadens* se ha tenido éxito al sustituir el suero por el PACSR en el proceso de enquistamiento (Barrón *et al.*, 2005).

El proceso de desenquistamiento resultó muy complejo en comparación con el enquistamiento, una vez que se obtuvieron estructuras quísticas resistentes a detergentes de la mayoría de los bioensayos, fueron colocados en medio para desenquistamiento, bajo la única condición en la cual se cumplió el ciclo de vida completo fue lavarlos con tritón X-100 a 0.0001% por 30 min, enjuagarlos muy bien con TYI-S-33 y reincubarlos en TYI-S-33 por 12 días, este fue uno de los bioensayos más sencillos que realizamos y en el cual se cumplió el ciclo de vida bajo condiciones axénicas de *E. histolytica in vitro*. Durante esta fase se observó una cantidad muy escasa de estructuras semejantes a quistes que cumplen el ciclo de vida, llegando a formar una nueva población en un lapso de 23 días aproximadamente. Un comportamiento similar se ha observado en proceso de desenquistamiento de otros protozoarios parásitos en experimentos *in vitro* como *E. invadens* y *Giardia lamblia* (Boucher y Guillin, 1990). Estos resultados fueron corroborados con repetición del bioensayo, de donde se desprende que el factor condicionante para el ciclo de vida de *E. histolytica* es partir de trofozoítos en excelentes condiciones de cultivo, ayuno de glucosa y alta tensión de CO₂. Al término de este trabajo, por primera vez se da evidencia del desarrollo del ciclo de vida axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*.

La inhibición de la inducción de estructuras semejantes a quistes por factores como teofilina, cafeína y fluoruro de sodio indican la posibilidad de la participación del AMP-cíclico en el proceso de diferenciación de *E. histolytica*, posibilidad no remota, ya que es conocida la acción de nucleósidos fosforilados en la diferenciación de organismos que presentan una fase amiboidea en su ciclo de vida como ocurre en *Dyctiostelium discoideum* (Gerish, 1987).

Recientemente, se ha reportado que a partir de *Castela texana* se aisló la chaparrina la cual ha mostrado actividad inhibitoria sobre el proceso de diferenciación de *Entamoeba invadens* bajo condiciones axénicas *in vitro* (Calzado *et al.*, 2007) sin embargo, no es conocido a que nivel tiene su acción inhibitoria.

El hecho de que las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* que lograron el desenquistamiento fueron únicamente aquellas que se sometieron a concentraciones bajas de tritón x-100 (0.0001%). Aunque esta concentración es suficiente para matar trofozoítos apoya la presencia de una pared protectora de la membrana celular, pero también sugiere que esta pared debe ser delgada, con menor grosor que la del quiste formado *in vivo*, lo que concuerda también con lo observado en la fotografía al MET (Fig.24) en los cuales la pared celular se observa mucho menos gruesa que en los quistes formados *in vivo* como se observa en la figura 46.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los trofozoítos pueden ser inducidos axenicamente *in vitro* a diferenciarse a estructuras con las características de un quiste de *Entamoeba histolytica* y que colocadas en un medio de crecimiento estas estructuras pueden desenquistarse o diferenciarse y formar nuevamente trofozoítos típicos con capacidad de volver a formar nuevamente estructuras quísticas, es decir el ciclo de vida de *E. histolytica* se logró reproducir axenicamente *in vitro*, lo cual fue el objetivo principal de esta tesis. De esta manera la metodología presentada en este trabajo puede ser una base importante para el estudio de la biología del enquistamiento de *E. histolytica* y abrir un nuevo frente hacia el control de la amibiasis al romper el ciclo de vida de este parásito precisamente sobre su fase infectiva: el quiste.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

9. CONCLUSIONES

- 1.- Empleando el medio TYI-S-33 y el Método TGC7 se logró reproducir el ciclo de vida axénico de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS *in vitro*.
- 2.- Para la inducción de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* que logren reproducir el ciclo de vida bajo condiciones axénicas *in vitro* es indispensable:
 - a) emplear trofozoítos en excelentes condiciones de cultivo.
 - b) reducir el potencial REDOX del medio TYI-S-33 empleando CO₂.
 - c) disminución de nutrientes en el medio TYI-S-33.
- 3.- Las estructuras semejantes a quistes obtenidas bajo condiciones axénicas *in vitro* presentan las siguientes características:
 - a) Son estructuras esféricas, la mayoría se encuentran distribuidas individualmente y en baja proporción se encuentran en agregados y sus dimensiones fluctúan de 10 a 40µm.
 - b) Presentan una pared celular delgada.
 - c) Presentan resistencia al tritón X-100 hasta 0.15% por 30 min.
 - d) Al microscopio de luz UV fluorescen intensamente en presencia de calcofluor M2r.
 - e) Son estructuras multinucleadas.
 - f) Carecen de cuerpos cromatóides, sólo presentan escasas hélices de ribonucleoproteínas
- 4.- El desenquistamiento de *E. histolytica* en el medio TYI-S-33, bajo condiciones axénicas *in vitro* es asincrónico.
- 5.- El extracto metanólico de *Castela texana* aún no siendo un compuesto puro inhibe significativamente la inducción de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*.
- 6.- Las sustancias puras NaF, cafeína, teofilina inhiben la inducción de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*, sin embargo no presentan diferencia significativa entre si y con respecto al control.

10. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, empleando el método TGC7 aquí descrito, permitirá en un futuro poder realizar trabajos enfocados al estudio y elucidación de los mecanismos celulares y moleculares involucrados durante cada etapa del ciclo de vida axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, también es de importancia el descifrar los factores clave implicados en el proceso de enquistamiento y desenquistamiento, así como realizar estudios de aspecto inmunológico que permitan establecer el mecanismo de acción de *E. histolytica* en pacientes con amibiasis franca y el comportamiento de *E. histolytica* en portadores asintomáticos, todos estos estudios en su conjunto encaminados a inhibir el ciclo de vida de *E. histolytica*. Aunque existe una considerable cantidad de estudios en los cuales evalúan el efecto de una gran cantidad de agentes químicos sobre el crecimiento de *E. histolytica*, sería conveniente realizar la búsqueda de nuevos fármacos que presenten menos efectos secundarios indeseables que el metronidazol y una buena opción de acuerdo a los resultados obtenidos sería la obtención de sustancias puras derivadas *Castela texana*, así como analizar el modo de acción de los agentes químicos aquí evaluados (NaF, cafeína y teofilina) y en un futuro emplear el conocimiento adquirido hacia el control de la amibiasis tanto a nivel del hospedero como del ambiente.

11. LITERATURA CITADA

Acevedo Garibay, M.A., 1993. Niveles de RNA en trofozoítos de *Entamoeba invadens* cepa IP-1 crecidos axenicamente con tensión normal y alta tensión de CO₂ en medio TYI-S-33 sin vitaminas. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL, Monterrey, N.L.

Algranati, D.I., Serra M. P., Carrillo C. y González. N., 2006. Modulation of oat arginine decarboxylase gene expression and genome organization in transgenic *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Federation of Biochemical Societies Journal* **273**:628-637.

Arroyo-Begovich, A., Carabéz-Trejo A., Ruiz-Herrera, J., 1980. Identification of the structural components in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *Journal of Parasitology* **66**:735-741.

Arroyo-Begovich, A., Carabéz-Trejo A., 1982. Location of chitin in the wall of *Entamoeba invadens* with colloidal gold tracers. *Journal of Parasitology* **68**:253-258.

Avron B, Stolarsky T., Chaayen A, Mirelman D., 1986. Encystation of *E. invadens* IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. *Journal of Protozoology* **33**:522-525.

Avron, B., R. M. Deutsch, and D. Mirelman. 1982. Chitin synthesis inhibitors prevent cyst formation by trophozoites. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **108**:815-821.

Balamuth, W., 1946. Improved egg yolk medium for cultivation of *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa. *American Journal of Clinical Pathology* **16**:380-384.

Barker, D.C. y Deutsch, K., 1958. The chromatoid body of *Entamoeba invadens*. *Experimental Cell Research* **15**:604-639.

Barrón-González, M.P., Villarreal-Treviño, L., Verduzco-Martínez, J.A., Mata-Cárdenas B.D., y Morales-Vallarta M.R., 2005. *Entamoeba invadens*: *In vitro* axenic encystation with a serum substitute. *Experimental Parasitology* **110**:318-321.

Batchricki-García, S. 1989. The biochemical cytology of chitin and chitosan synthesis in fungi. In *Chitin and Chitosan*. Ed. By Skjak-Brack G., Anthousen T. And Sadford P. London; Elsevier Applied Science, pp.23-36.

Boeck, W.C. and Drbohlav, J., 1925. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Hygiene* 5:371-407.

Boucher, S.E. y Guillin F.D., 1990. Excystation of *in vitro*-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infection and Immunity* 58:3516-3522.

Bray, R.S. 1996. Amoebiasis, The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases. The Wellcome Trust, London, United Kingdom. In F.E.C.Cox (ed), pp. 170-177.

Burk R.R., 1968. Reduced adenyl ciclase activity in a polyoma virus transformed cell line. *Nature* 219:1272-1275.

Byers, T.J. 1986. Molecular biology of DNA in *Acanthamoeba*, *amoeba*, *Entamoeba* and *Naegleria*. *International Journal of Cytology* 99:311-341.

Caballero-Salcedo, A., M. Viveros-Rogel, B. Salvatierra, R. Tapia-Conyer, J. Sepúlveda-Amor, G. Gutiérrez, and L. Ortiz-Ortiz. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50:412-419.

Calzado-Flores C., Verde-Star J., Morales-Vallarta M., Segura-Luna J.J., 2007. Inhibición del proceso de enquistamiento de *E. invadens* por *Castela texana*. *Revista Ciencia UANL* 10:44-48.

Campos-Góngora E, Ebert F, Willhoeft U, Said-Fernández S, Tannich E. 2004. Characterization of chitin synthases from *Entamoeba*. *Protist* 155:323-330.

Carliss J.O., Gojides M, Hall R.D., Kudo R.R., Levine N.D., Loeblich A.R., Jr Weiser J. and Wenrich D.H. 1969. A revised classification the phyllus protozoa. *Journal of Protozoology* 12:11-17.

Cervantes-Mamoa A. y Martínez-Palomo, A., 1980. Estudio del ciclo vital de *Entamoeba invadens* mediante cinematografía espaciada. *Archivos de Investestigación Médica (México)* 11:31-40.

Chang S. L., 1946. Studies in *Entamoeba histolytica* IV. The relation of oxidation reduction potentials to the growth, encystations and excistations of *Entamoeba histolytica* in culture. *Journal of Parasitology* 37:101-112.

Chávez-Munguía B., Martínez Palomo A., De la Torre M., 1978. Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de *Entamoeba invadens*, *E. histolytica* y *E. coli*. Archivos de Investigación Médica **9**:113-116.

Chávez-Munguía B., Cristóbal-Ramos AR., González-Robles A., Tsutsumi V., and Martínez-Palomo A., 2003. Ultrastructural study of *Entamoeba invadens* encystation and excystation. Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology **35**:235-243.

Chávez-Munguía B., Hernández-Ramírez V., Angel A., Rios A., Talamas-Rohana P., González-Robles A., González-Lazaro M., Martínez-Palomo A., 2004. *Entamoeba histolytica*: ultrastructure of trophozoites recovered from experimental liver lesions. Experimental Parasitology **107**:39-46.

Chinn B., Jacobs L., Reardon L. and Rees C., 1942. The influence of the bacterial flora on the cultivation of *Entamoeba histolytica*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **22**:137-146.

Clark, C.G., Espinosa Cantellano, M. and Bhattacharya, A. 2000 *Entamoeba histolytica*: an overview of the biology of the organism. in: Amebiasis (Ravdin J.I., ed.) Imperial College Press, London, pp. 1-45.

Clark, C.G., and L.S. Diamond. 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clinical Microbiology Reviews **15**:329-341.

Cleveland, L.R. and Sanders, E.P., 1930. The production of bacteria-free amoebic abscesses in the liver of cats and observations on the amoebae in various media with and without bacteria. Science **77**:149-151.

Councilman, W. T., and H. A. Lafleur., 1891. Amebic dysentery. Johns Hopkins Hospital Reports **2**:395-548.

Crosby, A. W., 1986. Ecological imperialism : the biological expansion of Europe, 900-1900. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.

Das S.R., Rastogi, A.K., Sagar P., y Singh, M.P., 1980. Axenic encystation of *Entamoeba invadens*. Indian Journal of Experimental Biology **18**:333-336.

Das S.R. y Guillin F.D., 1991. Chitin synthase in encysting of *Entamoeba invadens*. Biochemical Journal **280**:641-647

Diamond L.S., 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science **134**:336-337.

Diamond L.S., 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoeba. *Journal of Parasitology* **54**:1047-1056.

Diamond L.S., Harlow D. y Cunnick C.C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**:431-432.

Diamond L.S. y Cunnick C.C., 1991. A serum-free, partly defined medium, PDM-805, for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* schaudinn and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**:431-432.

Diamond, L.S. y Clark, C.G., 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *Journal of Eukariotic Microbiology* **40**:340-344.

Dobell, C. y Laidlaw, P.P., 1926. On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoebae. *Parasitology* **18**:238-318.

Dobell C., 1928. Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I. General Introduction, II. Description of the whole life-history of *Entamoeba histolytica* in culture. *Parasitology* **20**:357-412.

Dobell C., 1932. Antony van Leeuwenhoek and his "little animals". John Bale Sons and Danielsson, London, United Kingdom, pp.224-225.

Fahey, R.C., Newton G.L., Arrick B., Overdank-Bogart, T. Y Aley S.B., 1984. *Entamoeba histolytica*: a eukariote without glutathione metabolism, *Science* **224**:70-72.

Feria-Velasco A. and Tapia-Arizmendi G., 1977. Qualitative X-ray spectrometric study of *E. histolytica* trophozoite nuclei. *Archives of Medical Research* **8**:199-208.

Frye, W.W. y Melenay, H.E., 1939. Liver extract as a substitute for serum in the culture medium for *Entamoeba histolytica*. *Science* **89**:564-565.

Garibay de Hoyos, C.A., 1991. Niveles de RNA en trofozoítos de *Entamoeba invadens* IP-1 crecidos axenicamente en medio TP-S-1 con tensión normal y alta tensión de CO₂. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Monterrey, N.L.

García, L.S., and D.A. Bruckner. 1997. *Diagnostic medical parasitology*, 3rd ed. ASM Press.

Gerisch, G., 1987. Cycline AMP and other signals controlling cell development and differentiation in *Dictyostelium*. *Annual Review of Biochemistry* **56**:853-879.

González A.R., Haque R., Rehman T., 1992. A monoclonal antibody for distinction of invasive and noninvasive clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology* **30**:2807-2813.

González J., Guangxing B., Frevert U., Corey, E. J. y Eichinger D., 1999. Proteasome-dependent cyst formation and stage-specific ubiquitin mRNA accumulation in *Entamoeba invadens*. *European Journal of Biochemistry* **264**:897-904.

Gutiérrez G. y Muñoz O., 1994. Epidemiología de la amibiasis. Ed. Kretschmer R. Amibiasis, Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas.

Horsch M., Mayer C, and Rast D.M., 1996. Stereochemical requirements of chitin synthase for ligand binding at the allosteric site for N-acetylglucosamine *European Journal of Biochemistry* **237**:476-482.

Horst M.N., 2005. The biosynthesis of crustacean chitin by a microsomal enzyme from brine shrimp. *Journal of Biological Chemistry* **10**:1412-1419.

Imperato P.J. 1981. A historical overview of amebiasis. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* **57**:175-187.

Ivey, M. 1980. Phylum Protozoa, *In* A. C. Sonnenwirth and L. Jarett (ed.), *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. The C. V. Mosby Co., St. Louis, Mo, pp. 2081-2093.

Jackson T, 2000. Epidemiology. *En*: Ravdin J.I., editor. *Amebosis*. Londres: Imperial College Press, pp.47-63.

Kapoor O. P., 2006. Amoebic liver abscess. *Bombay Hospital Journal* **48**:4-6.

Katz M., Despommier DD. and Gwadz RW. 1989. *Parasitic diseases*. Springer-Verlag, New York, N.Y., pp.129-135.

Kartulis, S. 1886. Zur etiologie der dysenterie in Aegyptien. *Virchows Archives A: Pathological Anatomy and Histopathology* **105**:521-531.

Kean, B.H., 1988. A history of amebiasis., *In* J. I. Ravdin (ed.), *Amebiasis: human infection bu Entamoeba histolytica*. John Wiley&Sons, Inc., New York, N.Y., pp.1-10.

Kessel, J., Allison, D., Kaime, M., Quiros, M. y Gloeckner, A., 1944. The cysticidal effects of chlorine and ozone on cysts of *Entamoeba histolytica*, together with a comparative study of several encystment media. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **24**:177-183.

Kusamram, T., Sobhon, P., Bailey, G.B., 1975. The mechanism of formation of inhibitor induced ribosome helices in *Entamoeba invadens*. *The Journal of Cell Biology* **65**:529-539.

Lambl, V., 1859. Microscopische untersuchungen der darmexcrete. Beitrag zur pathologisches des darmes und zur diagnostik am krankenkette. *Viert. Prakt. Heilkd. (Prague)* **61**:1-57.

Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Lazos Ochoa M., 1994. Patología y patógena de la amibiasis, Segunda Reunión de Expertos en amibiasis. SERLE, Primera Edición 41-52.

Levine N.D., Carliss J.O., Cox F.E.G., Deroux G., Grain J., Honinger B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lin D., Lom J., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljanski G., Sprague V., Vavra J. and Walalace F.G., 1980. A new revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology* **27**:37-58.

Lösch F.A., 1875. Massive development of amoebae in the large intestine. *Arch. F. Path. Anat.*, LXV 196.

López-Romero, E. y Villagómez-Castro, J.C., 1993. Encystation in *Entamoeba invadens*. *Parasitology Today* **9**:225-227.

Loftus B., Anderson I., Davies R., Alsmark UCM., Samuelson J., Amedeo P., Roncaglia P., Beriman M., Hirt R.P., Mann B.J., Nozaki T., Suh. B., Pop M., Duchene M., Ackers J., Tannich E., Leippe M., Hofer M., Brucchaus I., Willhoeft U., Bhattacharya A., Chillingworth T., Churcher C., Hance Z., Harris B., Harris D., Jagel K., Moule S., Mungall K., Ormond D., Squares R., Whitehead S., Quail M.A., Rabbinowitsh E., Norbertczak H., Price C., Wang Z., Guillén N., Grilchrist C., Stroup S.E., Bhattacharya S., Lohia A., Foster P.G., Sicheritz-Ponten T., Weber C., Singh U., Mukherjee C., El-Sayed N.M., Petri W.A., Clark C.G., Embley M.T., Barrell B., Fraser C.M., Hall N. 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**:865-868.

Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S. & Takeuchi, T., 2004. Different effects of cytochalasins on the growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. *Parasitology Research* **93**:68-71.

Martínez-Palomo A.. 1982. The biology of *Entamoeba histolytica*. Primera Edición. Research studies Press-John Wiley & Sons LTD. pp 161.

Martínez-Palomo A., 1986. The biology of *Entamoeba histolytica*. Ed. Elsevier, Amsterdam, 2:11-43.

Martínez-Palomo A. 1987. Las amibas enemigos invisibles. Fondo de Cultura Económica, SEP. México, D.F.

Martínez-Palomo A. y Espinosa-Cantellano M., 2003. *Entamoeba histolytica*: Biología Celular y Molecular. Cap. 24. pp. 741-760.

Markell. E. K., D. T. John, and W. A. Krotoski., 1999. Lumen-dwelling protozoa, 8th ed. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.

Mata-Cárdenas, B. D. y Saíd-Fernández, S., 1986. Wall synthesis in axenic cultures of *E. histolytica* grown in PEHPS medium. Archives of Medical Research 25:25-30.

Mata-Cárdenas, B.D., Morales Vallarta M.R., Vargas Villarreal J. y Saíd-Fernández, S., 1996. PACSR: A serum replacement for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* in a serum-free media. Archives of Medical Research 28:106-107.

McLaughlin, J.. and S. Aley. 1985. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. Journal of Protozoology 32:221-240.

McConnachie E. W., 1962. A medium for the axenic cultivation of *E. invadens*. Nature 194:603-604.

McConnachie E. W., 1969. The morphology, formation and development of cyst of *Entamoeba*. Parasitology 59:41-53.

Meleney H.E., Snyder T.L., 1940. The excystation of *Endamoeba histolytica* in bacteriologically sterile media. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 21:63-73.

Merz R.A., Horsch M., Nyhlen L.E. and Rost D.M., 1999. Biochemistry of chitin synthase. In chitin and chitinases. Ed. By Jolles P. And Muzzarelli RAA, Switzerland pp.9-37.

Monwell, M.D., 1968. Introduction to protozoology. Second revised edition., Dover Publications Inc., New York. P:85.

Morales-Vallarta M, Mata BD, Ramirez-Bon E, Segura JJ. 1982. Nuclear division and presence of microtubules in the differentiation of *Entamoeba invadens*. Archives of Medical Research 3:211-216.

Morales-Vallarta M., Carranza-Rosales M., Ruiz-Ordoñez J., Verduzco-Martinez J., 1989. Cell wall morphogenesis during differentiation of *Entamoeba invadens* (Protozoa: Sarcodina). Transactions of the American Microscopical Society 108:204-207.

Morales-Vallarta M. R, 1991. Inducción de cuerpos cromatoides en trofozoitos que crecen en fase log y diferenciación de *Entamoeba invadens* por alta tensión de CO₂ Aspectos en la formación de la pared del quiste. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL., Monterrey, N.L.

Morales-Vallarta M. y Villarreal-Treviño L., 1997. *Entamoeba invadens* differentiation and *Entamoeba histolytica* cyst-like formation induced by CO₂. Archives of Medical Research 28:150-151.

Moran P., Ramos F., Ramiro M., Curiel O., González E., Valadez A., Gómez A., García G., Melendro E.I., Ximénez C. 2005. *Entamoeba histolytica* and/or *Entamoeba dispar*: Infection frequency in HIV⁺/AIDS patients in México city. Experimental Parasitology 110:331-334.

Muñoz M.L., Lamoyi E. and León G., 1990. Antigens in electron-dense granules from *Entamoeba histolytica* as possible markers for pathogenicity. Journal of Clinical Microbiology 28: 2418-2424.

Nayeem MA, Habibullah CM, Saleem Y, Quadri GS, Ishaq M., 1993. *In vitro* encystation and excystation of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Indian Journal Experimental Biology 6:562-563.

Neff R.J. y Benton W.F., 1964. Localization of cellulose in the cysts of *Acanthamoeba* sp. Journal of Protozoology 9:11-13.

Nelson E.C., 1947. Alcoholic extract medium for the diagnosis and cultivation of *Entamoeba histolytica*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 27:545-552.

OMS, 1997. Amoebiasis-An expert consultation. Weekly Epidemiological Record No.14. Ginebra, Abril.

Osler, W. 1890. On the amoeba coli in dysentery and in dysenteric liver abscess. Bulletin of The John Hopkins Hospital 1:53-57.

Pall M.L., 1981. Adenosine 3'-5'-monophosphate in fungi. *Microbiological Reviews* 45:462-480.

Pérez-Arellano, J.L., Muro-Álvarez A., Hernández-Caballero M. y Martín-Sánchez A.M. 2002. Amebosis. *Medicine* 8:3731-3741.

Petri W.A., Jackson T.F., Gathiram V. 1990. Pathogenic and non pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infection and Immunity* 58:1802-0806.

Proctor E.M. and Gregory M.A. 1973. Ultrastructure of cysts of *E. histolytica*. *International Journal of Parasitology* 3:455-456.

Pumarola, A.; Rodríguez Torres, A.; García Rodríguez, J.A; Piedrola Angulo G. 1987. *Microbiología y Parasitología Médica*. 2 Edición. Barcelona: Salvar Editores. S. A., p.908.

Quinke, H., and E. Ross. 1893. Ueber Amöben-Enteritis. *Berl. Klin. Wochenscher.* 30:1089-1094.

Rengpein S., Bailey G. B., 1975. Differentiation of *Entamoeba*: a new medium and optimal conditions for axenic encystation of *Entamoeba invadens*. *Journal of Parasitology* 61:24-30.

Reed S.L. y Flores MB., 1992. Molecular and cellular characterization of the 29 kilodalton peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infection and Immunity* 60:542-549.

Romero-Caballero R., 1994. Introducción de amibiasis, Segunda reunión de expertos, Primera Edición, SEARLE de México, pp:47-55.

Rivera P.R. y Correa-Lemus I., 1986. Enquistamiento axénico de *E. histolytica*. *Archivos de Investigación Médica (Mex.)* 17:19-23.

Sargentum P.G., Williams J.E., Grene J.D. 1978. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72:519-521.

Schaudinn, F. R., 1903. On the development of some Rhizopoda (Preliminary Report) En: Kean B. H., Mott K.E., Russell A.J., eds. *Tropical Medicine and Parasitology Classic Investigations*, London United Kingdom: Cornell University Press; 1978. 1:110-118.

Schaumburg, H. H., Spencer P.S., Thomas P.K., 1983. Toxic neuropathy: Pharmaceutical agents. In disorders in peripheral nervs. Contemporary neurology series. Phyladelphia, pp.119-130.

Saíd-Fernández, S., Vargas Villarreal, J., Castro-Garza., Mata-Cárdenas, B.D., Navarro-Marmolejo, L., Lozano Garza, G y Martínez-Rodríguez, H., 1988. PEHPS medium: An alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **82**:249-253.

Saíd-Fernández, S., Mata-Cárdenas, B.D., González-Garza, M.T., Navarro-Marmolejo, L., Rodríguez-Pérez E., 1993. *Entamoeba histolytica* cyst whit a defective wall formed under axenic condition. Parasitology Research **79**:200-2003.

Saíd-Fernández, S., Mata-Cárdenas, B.D., Castro-Garza, J., Martínez-Rodríguez, H., Navarro-Marmolejo, L., Lozano Garza, G., 1992. Axenic massive cultivation of *Entamoeba histolytica* trophozoites in spinner flasks and in a microfermentor. Archives of Medical Research **23**:57-58.

Savioli, L. Stausfield. S., Bundy D.A.P., Mtel, L.A., Bhatia R., Engels D., Montresor A., Neira M., Shein A. 2002. Schistosomiasis and soil transmitted helmintics infections: forgoins control efforts. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **96**:577-579.

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. Journal of Protozoology **12**:448-459.

Silberman, J.D., Clarck, C.G., Diamond, L.S., Sogin, M. L., 1999. Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small subunit ribosomal RNA genes sequence analysis. Molecular Biology and Evolution **16**:1740-1751.

Snyder, T.L. y Meleney, H.E., 1941. Anaerobiosis and cholesterol as growth requirements of *Endamoeba histolytica*. Journal of Parasitology **29**:278-284.

Spurr A. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Journal of Ultrastructure Research **26**:31-43.

Steel, G. D., Torrie, J.H., Dickey, D.A., 2000. Procedures Statistics Biometrical Approach. Series in probability and statics. 3era ed. McGraw-Hill.

Stoll N.R., 1957. Axenic culture of *E. invadens* in the absence of tissue. Journal of Protozoology **4**:6.

Stone, W., 1935. A method of producing encystment in cultures of *Entamoeba histolytica*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **15**:681-684.

Strickler J.E., Patton C.L., 1975. Adenosine 3'.5'-monophosphate in reproducing and differentiated *Trypanosomas*. Science **190**:1110-1112.

Tellam R.L. Vuocolo T., Jonson S., Jarney J. and Pearson R.D., 2000. Insect chitin synthase: c:DNA sequence, gene organization and expression. European Journal of Biochemistry **267**:6025-6042.

Thepsuparungsikul, V., Seng L., and Bailey G. B., 1971. Differentiation of *Entamoeba*: Encystation of *Entamoeba invadens* in monoxenic and axenic cultures. Journal of Parasitology **57**:1288-1292.

Torian B.E., Reeds S.L., Creely C.M., Coward J.E., Vial K., Stamm W.E., 1990. The 96 kilodalton antigen as an integral membrane protein in pathogenic *Entamoeba histolytica*: potential differences in pathogenic and non pathogenic isolates. Infection and Immunity **58**:753-760.

Valdéz-Aguirre A., Villarreal-Treviño L, Vargas-Villarreal J., Mata-Cárdenas B.D., Morales-Vallarta M., 2000. Effect of agents that modified cAMP levels on growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. Archives of Medical Research **31**:S198-S199.

Van Dellen K.J., Bulik D.A.S., Specht C.A., Robbins P.W., Samuelson J.C., 2006. Heterologous expression of an *Entamoeba histolytica* chitin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukariotic Cell **5**:203-206.

Vaidya, A.B., and D.K. Ray. 1982. Amoebiasis: the tropical source. Science Today India, p.21-26.

Verna, K.K., Raizada M.K., Krishna-Murti C.R., 1974. Effect of bioamines on the cellular differentiation of *Hartmanella culbertsoni*. Biochemistry Pharmacology **23**:57-59.

Villarreal-Treviño, L. 1990. Nuevo método de enquistamiento axénico de *Entamoeba invadens* e inducción de cuerpos cromatoides en fase activa de crecimiento. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL., Monterrey, N.L.

Walker E.L. and Sellards A.W., 1913. Experimental entamoebic dysentery. Tropical Medicine and Parasitology **8**:253-330.

www.centerdiseasescontrol.com

Zuckrman, L. y Meleney, H., 1945. A fluid medium for the encystations of *Entamoeba histolytica* under reduced atmospheric pressure. Journal of Parasitology **31**:155-157.

Anexo-A

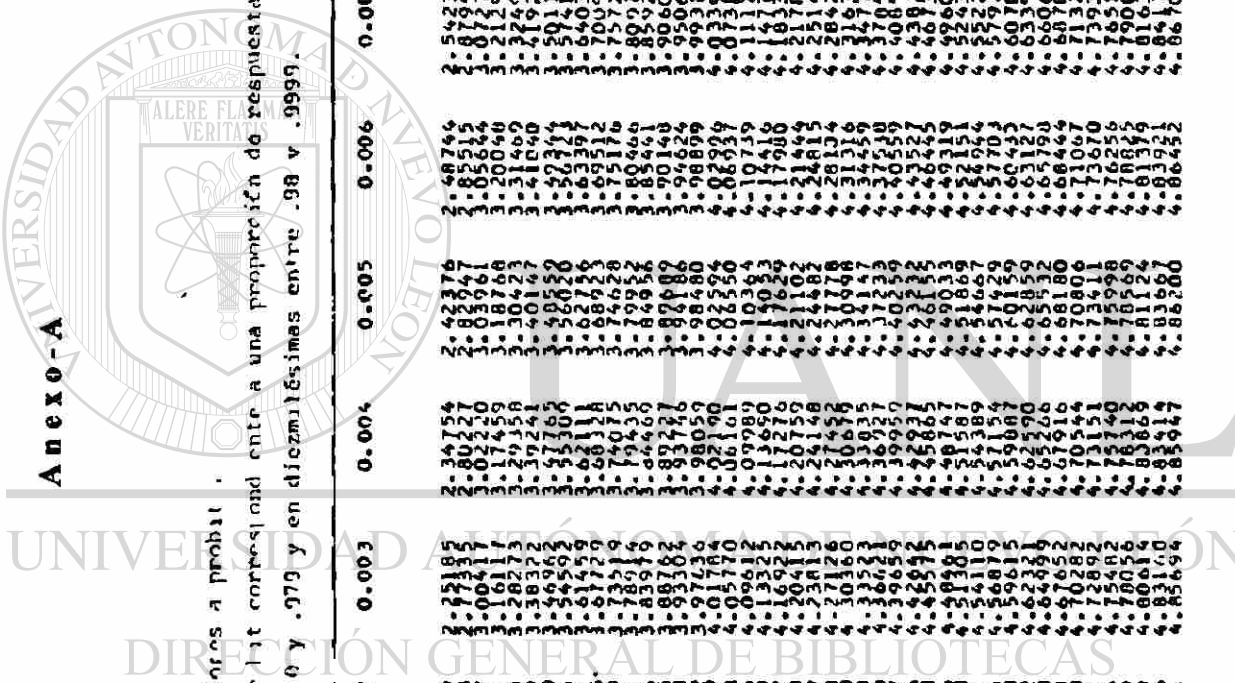


Tabla B. Tipos de... La tabla muestra la proporcion de respuestas dadas, con incrementos en milésimas entre 0 y .999.

Table with columns: 0.0, 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.007, 0.008, 0.009. Rows contain numerical data points corresponding to each interval.

APENDICE TÉCNICO

TABLA B. (Continúa).

| | 0.0 | 0.001 | 0.002 | 0.003 | 0.004 | 0.005 | 0.006 | 0.007 | 0.008 | 0.009 |
|-------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0.90 | 6.28173 | 6.28748 | 6.29322 | 6.29902 | 6.30488 | 6.31071 | 6.31672 | 6.32271 | 6.32875 | 6.33482 |
| 0.91 | 6.34097 | 6.34716 | 6.35339 | 6.35969 | 6.36603 | 6.37243 | 6.37889 | 6.38541 | 6.39199 | 6.39862 |
| 0.92 | 6.40536 | 6.41207 | 6.41881 | 6.42558 | 6.43236 | 6.43919 | 6.44606 | 6.45298 | 6.45994 | 6.46695 |
| 0.93 | 6.47080 | 6.47835 | 6.48593 | 6.49354 | 6.50119 | 6.50888 | 6.51661 | 6.52438 | 6.53219 | 6.54004 |
| 0.94 | 6.54521 | 6.55405 | 6.56293 | 6.57185 | 6.58081 | 6.58981 | 6.59884 | 6.60791 | 6.61701 | 6.62614 |
| 0.95 | 6.63529 | 6.64502 | 6.65479 | 6.66461 | 6.67447 | 6.68437 | 6.69431 | 6.70429 | 6.71431 | 6.72437 |
| 0.96 | 6.73437 | 6.74501 | 6.75570 | 6.76644 | 6.77722 | 6.78804 | 6.79890 | 6.80980 | 6.82074 | 6.83172 |
| 0.97 | 6.84274 | 6.85416 | 6.86562 | 6.87712 | 6.88866 | 6.90024 | 6.91186 | 6.92352 | 6.93522 | 6.94695 |
| 0.98 | 6.95871 | 6.97116 | 6.98365 | 6.99618 | 7.00875 | 7.02136 | 7.03401 | 7.04670 | 7.05943 | 7.07220 |
| 0.99 | 7.08501 | 7.09825 | 7.11153 | 7.12485 | 7.13821 | 7.15161 | 7.16505 | 7.17853 | 7.19205 | 7.20561 |
| 0.980 | 7.05415 | 7.06742 | 7.08074 | 7.09411 | 7.10752 | 7.12097 | 7.13446 | 7.14799 | 7.16156 | 7.17517 |
| 0.981 | 7.17881 | 7.19247 | 7.20617 | 7.21991 | 7.23368 | 7.24749 | 7.26134 | 7.27522 | 7.28913 | 7.30307 |
| 0.982 | 7.31704 | 7.33091 | 7.34481 | 7.35874 | 7.37270 | 7.38669 | 7.40071 | 7.41476 | 7.42884 | 7.44294 |
| 0.983 | 7.45706 | 7.47121 | 7.48539 | 7.49960 | 7.51384 | 7.52811 | 7.54241 | 7.55673 | 7.57108 | 7.58545 |
| 0.984 | 7.59985 | 7.61427 | 7.62872 | 7.64320 | 7.65770 | 7.67222 | 7.68676 | 7.70133 | 7.71592 | 7.73053 |
| 0.985 | 7.74516 | 7.75980 | 7.77446 | 7.78914 | 7.80385 | 7.81858 | 7.83333 | 7.84810 | 7.86289 | 7.87770 |
| 0.986 | 7.89253 | 7.90735 | 7.92219 | 7.93705 | 7.95193 | 7.96683 | 7.98175 | 7.99669 | 8.01165 | 8.02663 |
| 0.987 | 8.04163 | 8.05665 | 8.07169 | 8.08675 | 8.10183 | 8.11693 | 8.13205 | 8.14719 | 8.16235 | 8.17752 |
| 0.988 | 8.19271 | 8.20782 | 8.22295 | 8.23810 | 8.25327 | 8.26846 | 8.28367 | 8.29889 | 8.31413 | 8.32939 |
| 0.989 | 8.34466 | 8.35993 | 8.37522 | 8.39053 | 8.40586 | 8.42121 | 8.43658 | 8.45197 | 8.46738 | 8.48281 |
| 0.990 | 8.49826 | 8.51368 | 8.52912 | 8.54458 | 8.56006 | 8.57556 | 8.59108 | 8.60662 | 8.62218 | 8.63775 |
| 0.991 | 8.65334 | 8.66894 | 8.68456 | 8.70020 | 8.71586 | 8.73154 | 8.74724 | 8.76296 | 8.77870 | 8.79446 |
| 0.992 | 8.81023 | 8.82605 | 8.84189 | 8.85775 | 8.87363 | 8.88953 | 8.90545 | 8.92139 | 8.93735 | 8.95332 |
| 0.993 | 8.96931 | 8.98532 | 9.00135 | 9.01740 | 9.03347 | 9.04956 | 9.06567 | 9.08180 | 9.09795 | 9.11411 |
| 0.994 | 9.13029 | 9.14650 | 9.16273 | 9.17898 | 9.19525 | 9.21154 | 9.22785 | 9.24418 | 9.26053 | 9.27690 |
| 0.995 | 9.29329 | 9.30972 | 9.32617 | 9.34264 | 9.35913 | 9.37564 | 9.39217 | 9.40872 | 9.42529 | 9.44188 |
| 0.996 | 9.45849 | 9.47512 | 9.49177 | 9.50844 | 9.52513 | 9.54184 | 9.55857 | 9.57532 | 9.59209 | 9.60888 |
| 0.997 | 9.62569 | 9.64251 | 9.65935 | 9.67621 | 9.69309 | 9.70999 | 9.72691 | 9.74385 | 9.76081 | 9.77778 |
| 0.998 | 9.79478 | 9.81180 | 9.82884 | 9.84590 | 9.86298 | 9.88008 | 9.89720 | 9.91434 | 9.93150 | 9.94867 |
| 0.999 | 9.96586 | 9.98306 | 10.00028 | 10.01752 | 10.03478 | 10.05206 | 10.06936 | 10.08668 | 10.10402 | 10.12138 |

Anexo - B

ECUACIONES

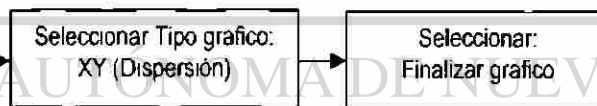
Durante el desarrollo de este trabajo determinamos la CI_{50} de los siguientes agentes químicos: cafeína, teofilina, NaF, extracto metanólico de *Castela texana* y metronidazol. En esta sección se muestra el procedimiento para determinar la CI_{50} del extracto metanólico de *Castela texana* sobre un cultivo axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. Los pasos son los siguientes:

- 1.- Preparar la solución madre a una concentración de 0.01g/mL.
- 2.- Evaluar sobre el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica*, cultivado a 37°C/ 72 h las concentraciones de 0.5mg/mL, 0.35 mg/mL y 15 mg/mL.
Nota. Preparar en total 3 ensayos por triplicado para cada concentración y para el control.
- 3.- Determinar el número de cel/mL de cada tubo y obtener el promedio.
- 4.- Vaciar los datos a la siguiente tabla.

| Dosis a evaluar mg/mL | Log de la Dosis | Células vivas (control) | Células muertas | Células Muertas / vivas | PROBIT |
|-----------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|---------|
| Control | | 68,958 | 0 | - | - |
| 0.50 | -0.301 | 1250 | 67292 | 0.9758 | 6.96039 |
| 0.35 | -0.4559 | 30,000 | 38958 | 0.5649 | 5.16079 |
| 0.15 | -0.8239 | 48125 | 20833 | 0.3021 | 4.48174 |

- 5.- Graficar Log. de la Dosis a evaluar / valor PROBIT, en el siguiente orden.

| Log Dosis | valor Probit |
|-----------|--------------|
| -0.301 | 6.96 |
| -0.4559 | 5.27 |
| -0.8239 | 4.48 |

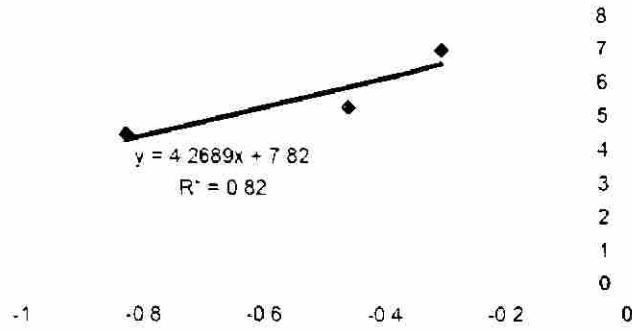


Una vez graficado, colocar el cursor en uno de los puntos y oprimir el lado derecho del ratón.

Se desplegarán una serie de datos, de estos seleccionar en el siguiente orden

- a) Agregar línea de tendencia
- b) Lineal
- c) Opciones: Presentar ecuación en el grafico y Presentar valor de R^2 en el grafico
- d) Aceptar

6 -Se obtendra la siguiente grafica con los valores de Y y la R²



7 - Despejar de la ecuacion $y = 1.4449X + 6.098$ el valor de X, en el entendido de que y 5, y sustituirlo en la ecuacion

8 - $5 = 4.2689 X + 7.82$

9 - Despejar X

10 - $X = \frac{5 - 7.82}{4.2689}$

11 - (-0.6605)

12 - Antilog (-0.6605)

13 - 0.218

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por lo tanto se requieren 0.218 mg/mL del extracto metanolico de *Castela texana* para matar al 50% de la poblacion de *Entamoeba histolytica* cultivada bajo condiciones axenicas en el medio FYI-S-33

Anexo - C

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook 1

Normality Test: Failed ($P < 0.050$)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in Notebook 1

| Group | N | Missing | Median | 25% | 75% |
|--------------------|---|---------|--------|--------|--------|
| Control | 3 | 0 | 96 000 | 95 250 | 97 500 |
| Calcofluor M2r | 3 | 0 | 37 000 | 28 750 | 49 600 |
| Metronidazol | 3 | 0 | 35 000 | 32 000 | 38 000 |
| NaF | 3 | 0 | 58 000 | 45 925 | 70 000 |
| Cafeina | 3 | 0 | 64 000 | 59 500 | 65 950 |
| Teofilina | 3 | 0 | 64 100 | 60 950 | 67 025 |
| EM <i>C.texana</i> | 3 | 0 | 54 200 | 51 650 | 56.300 |

H = 18.782 with 7 degrees of freedom ($P = 0.009$)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance, there is a statistically significant difference ($P = 0.009$)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)

| Comparison | Diff of Ranks | q | P<0.05 |
|-------------------------------|---------------|-------|-------------|
| Control vs Metronidazol | 59 000 | 4 817 | Yes |
| Control vs Calcofluor M2r | 56 000 | 4 572 | Yes |
| Control vs EM <i>C.texana</i> | 43 000 | 3 511 | Yes |
| Control vs NaF | 30 000 | 2 449 | Do Not Test |
| Control vs Cafeina | 23 000 | 1 878 | Do Not Test |
| Control vs Teofilina | 18 000 | 1 470 | Do Not Test |
| Teofilina vs Metronidazol | 41 000 | 3 348 | No |

| | | | |
|--------------------------------------|--------|-------|-------------|
| Teofilina vs Calcofluor M2r | 38 000 | 3.103 | Do Not Test |
| Teofilina vs EM <i>C.texana</i> | 25 000 | 2.041 | Do Not Test |
| Teofilina vs NaF | 12 000 | 0.980 | Do Not Test |
| Teofilina vs Cafeina | 5 000 | 0.408 | Do Not Test |
| Teofilina vs Cafeina | 5.000 | 0.408 | Do Not Test |
| Cafeina vs Metronidazol | 36 000 | 2.939 | Do Not Test |
| Cafeina vs Calcofluor M2r | 33 000 | 2.694 | Do Not Test |
| Cafeina vs EM <i>C.texana</i> | 20 000 | 1.633 | Do Not Test |
| Cafeina vs NaF | 7 000 | 0.572 | Do Not Test |
| Cafeina vs Cafeina | 0 000 | 0.000 | Do Not Test |
| Cafeina vs Metronidazol | 36 000 | 2.939 | Do Not Test |
| Cafeina vs Calcofluor M2r | 33 000 | 2.694 | Do Not Test |
| Cafeina vs EM <i>C.texana</i> | 20 000 | 1.633 | Do Not Test |
| Cafeina vs NaF | 7 000 | 0.572 | Do Not Test |
| NaF vs Metronidazol | 29 000 | 2.368 | Do Not Test |
| NaF vs Calcofluor M2r | 26 000 | 2.123 | Do Not Test |
| NaF vs EM <i>C.texana</i> | 13.000 | 1.061 | Do Not Test |
| EM <i>C.texana</i> vs Metronidazol | 16 000 | 1.306 | Do Not Test |
| EM <i>C.texana</i> vs Calcofluor M2r | 13 000 | 1.061 | Do Not Test |
| Calcofluor M2r vs Metronidazol | 3 000 | 0.245 | Do Not Test |

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between the two rank sums that enclose that comparison. For example, if you had four rank sums sorted in order, and found no significant difference between rank sums 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed rank sums is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the rank sums, even though one may appear to exist.

GLOSARIO

Absceso hepático amibiano: El absceso hepático amebiano es una acumulación de pus en el hígado causada por el parásito intestinal *Entamoeba histolytica*. Es la complicación extraintestinal más común de la amebiasis. La mayoría de los pacientes presentan un cuadro agudo de menos de 10 días de fiebre y dolor abdominal. El síntoma más común es un dolor sordo en el cuadrante superior derecho que se puede irradiar al hombro. También puede haber dolor epigástrico o pleurítico. Una hepatomegalia con dolor es el signo más sugestivo pero no es diagnóstico. La mayoría de los pacientes tienen fiebre. Aunque todos los pacientes hayan tenido infección intestinal antes del desarrollo del absceso, menos del 30% tienen diarrea al momento de presentar las manifestaciones del absceso hepático. Una minoría de pacientes pueden presentar un curso crónico con síntomas subagudo por más de dos semanas. Estos más probablemente mostrarán una enfermedad emaciante con hepatomegalia, pérdida de peso, y anemia. Las presentaciones atípicas pueden incluir falta de aliento, tos secundaria a efusión pleural, o a ruptura de absceso en el espacio pleural. Los hallazgos de laboratorio asociados con el absceso hepático amebiano incluyen leucocitosis sin eosinofilia, anemia moderada en más de la mitad de los casos, niveles elevados de fosfatasa alcalina en el 80% de los casos, transaminasas elevadas en los casos severos y velocidad de eritrosedimentación aumentada.

Acetil-coenzima-A: El acetil-CoA es el producto común de la degradación de los principales combustibles metabólicos (polisacáridos, lípidos y proteínas). El grupo acetilo es degradado a CO_2 y H_2O vía el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa o utilizado para la síntesis de ácidos grasos. El Acetil-CoA (Ac-CoA) es el producto común del metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. El Ac-CoA es un compuesto de alta energía. El ΔG para la hidrólisis de su enlace tioéster es de $-31.5 \text{ kJ mol}^{-1}$, lo que hace a la reacción un poco más exergónica que la hidrólisis del ATP ($\approx 1 \text{ kJ mol}^{-1}$). El Ac-CoA es sintetizado a partir de piruvato a través de una descarboxilación oxidativa catalizada por el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa (PDH).

Actina: (del griego *aktis* rayo) Proteína compuesta por subunidades globulares que forma microfilamentos, uno de los tres componentes fundamentales del citoesqueleto de las células eucariotas. Se expresa en todas las células del cuerpo y especialmente en las musculares ya que está implicada en la contracción muscular, por interacción con la miosina. Puede encontrarse en forma libre o polimerizarse en microfilamentos, que son esenciales para funciones celulares tan importantes como la movilidad y la contracción de la célula durante la división celular.

Adenina: Es una de las cinco bases nitrogenadas que forman parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y en el código genético se representa con la letra A. En el ADN la adenina siempre se empareja con la timina. Forma los nucleosidos adenosina (Ado) y desoxiadenosina (dAdo), y los nucleótidos adenilato (AMP) y desoxiadenilato (dAMP).

Su fórmula es $C_5H_5N_5$. Es un derivado de la purina (es una base purica) en la que un hidrogeno ha sido sustituido por un grupo amino (NH_2). La adenina, junto con la timina, fue descubierta en 1885 por el bioquímico alemán Albrecht Kossel.

Adenosil Monofosfato cíclico: molécula formada por un nucleótido que sirve de señal entre el receptor postsináptico y el canal por el que se mueven los iones, que a su vez cambian el estado eléctrico de la neurona.

Adherencia celular: Unión que presentan las células entre sí o para fijarse al sustrato. La adherencia celular requiere la presencia en la membrana celular de proteínas específicas para la unión, que a menudo se asocian entre sí formando complejos de unión proteica. Unión que presentan las células entre sí o para fijarse al sustrato. La adherencia celular requiere la presencia en la membrana celular de proteínas específicas para la unión, que a menudo se asocian entre sí formando complejos de unión proteica. Unión que presentan las células entre sí o para fijarse al sustrato. La adherencia celular requiere la presencia en la membrana celular de proteínas específicas para la unión, que a menudo se asocian entre sí formando complejos de unión proteica.

ADN (ácido desoxirribonucleico): Un ácido nucleico compuesto de dos cadenas polinucleotídicas que se disponen alrededor de un eje central formando una doble hélice, capaz de autorreplicarse y codificar la síntesis de ARN. Lugar donde está "depositada" la información genética. Ácido nucleico que funciona como soporte físico de la herencia en el 99% de las especies. La molécula, bicatenaria, está formada por dos cadenas antiparalelas y complementarias entre sí. Su unidad básica, el nucleótido, consiste en una molécula del azúcar desoxirribosa, un grupo fosfato, y una de estas cuatro bases nitrogenadas: adenina, timina, citosina y guanina.

Ameba: Protozoo rizópodo unicelular que se caracteriza por su forma cambiante, puesto que carece de pared celular, y por su movimiento ameboide a base de pseudópodos, que también usa para capturar alimentos. Unas especies viven libres en agua o tierra, y otras en el intestino del hombre o de los animales.

Amebaporo: Esta proteína está formada por 4 hélices alfa y existen 3 isoformas denominadas A, B, y C, de las cuales la C es la más activa. Forma canales que permiten el paso de iones, agua y moléculas pequeñas, lo cual altera el equilibrio osmótico de la célula y lleva a su lisis. Ejercen actividad histolítica *in vitro* contra varias líneas celulares humanas y se localizan en vesículas citoplasmáticas del trofozoito de *E. histolytica*. No se ha demostrado que sean secretadas por los trofozoítos, así que su actividad es intracelular para digerir las células previamente fagocitadas. Su estructura es muy similar a la de otras proteínas porinas.

Ameboma: Es una presentación inusual de la amibiasis intestinal que ocurre en menos del 1% de los pacientes con enfermedad invasora intestinal. La mayoría de los pacientes presentan una masa intestinal que puede presentar dolor a la palpación. En la radiografía el ameboma se confunde con un carcinoma de colon. Una prueba serológica o una biopsia evitarían una cirugía innecesaria.

Amibiasis: La amibiasis o amebiasis es una infección ocasionada por un parásito protozario unicelular llamado *Entamoeba histolytica*.

Anaerobio facultativo: Es un ser vivo, que crece tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

ATP (adenosín trifosfato): El principal producto químico utilizado por los sistemas vivientes para almacenar energía, consiste en una base (adenina) unida a un azúcar (ribosa) y a tres fosfatos.

Bases nitrogenadas: Son compuestos orgánicos cíclicos, que incluyen dos o más átomos de nitrógeno. Son parte fundamental de los nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos. Biológicamente existen cinco bases nitrogenadas principales, que se clasifican en dos grupos, bases púricas (derivadas de la estructura de la purina) y bases pirimidínicas (derivadas de la estructura de la pirimidina). La adenina (A) y la guanina (G) son púricas, mientras que la timina (T), la citosina (C) y el uracilo (U) son pirimidínicas. Las cuatro primeras bases se encuentran en el ADN, mientras que en el ARN en lugar de timina existe el uracilo. Las bases nitrogenadas son complementarias, lo cual constituye la clave de la estructura del ADN y tiene importantes implicaciones, pues permite procesos como la replicación del ADN y la traducción del ARN en proteínas.

Bilis. Es una sustancia líquida alcalina amarillenta producida por el hígado de muchos vertebrados. Interviene en los procesos de digestión funcionando como emulsionante de los ácidos grasos. Su secreción es continua, por lo que en los periodos interdigestivos se almacena en la vesícula biliar, y se libera al duodeno tras la ingesta de alimentos. La composición de la bilis es la siguiente: líquido ácido, neutro o ligeramente alcalino, formado por sales biliares, proteínas, colesterol, hormonas y enzimas.

Cafeína La cafeína es un alcaloide de la familia metilxantina, que también incluye los compuestos teofilina y teobromina, con estructura química similar. En estado puro es un polvo blanco muy amargo. Fue descubierta en 1819 por Ruge y descrita en 1821 por Pelletier y Robiquet. Su fórmula química es $C_8H_{10}N_4O_2$, su nombre sistemático es 1,3,7-trimetilxantina o 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona.

La **cafeína** es un compuesto alcaloide (del grupo de las xantinas) que actúa como estimulante en los humanos. La cafeína se encuentra principalmente en los frutos de la planta de café, en la planta de té, en la yerba mate, y en las bayas de guaraná. En pequeñas cantidades se puede encontrar en el cacao y en la nuez de kola. En general, la cafeína se encuentra en las semillas, hojas, y frutos de más de 60 plantas, en las que actúa como un pesticida natural que paraliza y mata ciertas clases de insectos cuando se alimentan de éstas.

Centrifugación diferencial: Es el método más común de separación, y es rara la purificación enzimática que no lo utiliza. En este método, el tubo de centrifuga se llena con una mezcla uniforme problema. Tras la centrifugación se obtienen dos fracciones: un pellet que contiene el material sedimentado y un sobrenadante con el material no sedimentado. El método es bastante inespecífico, y a priori no se puede saber si la partícula buscada quedará en el sobrenadante, en el pellet o repartido entre ambos; sin embargo es una técnica muy útil, sobre todo para aislamiento de células y orgánulos subcelulares.

Citoesqueleto: Entramado tridimensional de microtúbulos y filamentos que proveen el soporte interno para las células, anclan las estructuras internas de la misma e interviene en los fenómenos de movimiento celular y en su división.

Colitis aguda: Los pacientes con colitis amibiana aguda usualmente se presentan con una historia de 1 a 2 semanas de dolor abdominal, tenesmo y frecuentes evacuaciones diarreicas con moco y sangre. Pueden agregarse otros síntomas como dolor lumbar y flatulencia. Una minoría de los pacientes presentan fiebre, lo que contrasta con la disentería bacilar, y en algunos la diarrea puede causarles deshidratación. En la mayoría de los casos hay sensibilidad abdominal a la palpación. En la endoscopia se observa la apariencia característica de pequeñas úlceras hemorrágicas con una mucosa normal entre ellas.

Colitis fulminante: Es una complicación inusual de la disentería amibiana que tiene un pronóstico grave, con una mortalidad mayor de 50%. Clínicamente los pacientes se presentan con una diarrea sanguinolenta muy severa y fiebre, seguida de una instalación rápida de dolor abdominal difuso. El progreso puede ser tan rápido que la rigidez abdominal se ha presentado sólo en un 25% de pacientes con perforación intestinal detectada mediante cirugía. Los niños de menor edad tienen más riesgo de presentar colitis fulminante. El desarrollo clínico de la colitis fulminante está asociado con la extensión de las úlceras hasta la serosa.

Cromatina: (del griego chroma = color) Complejo de ADN y proteínas histónicas que en células eucariotas se dispersa en el núcleo durante la interfase y se condensa en cromosomas durante la meiosis y mitosis.

Ectoplasma: Es la region periferica de la célula, carece de granulos y es de mayor densidad que el endoplasma. En contacto directo con la membrana plasmatica. Presenta iones calcio, magnesio y potasio. Presenta microtubulos y microfilamentos que forman el citoesqueleto. Los microfilamentos forman la red terminal. El ectoplasma es de manera gelatinosa y se encuentra debajo de la membrana plasmatica.

Endoplasma: Menos denso que el ectoplasma, se encuentra próximo al nucleo. En el encontramos las siguientes estructuras: mitocondrias, cloroplastos, centriolos, aparato de Golgi, lisosomas, y el reticulo endoplasmatico.

Entamoeba histolytica: Es un parasito anaerobio eucariota protozoo con forma ameboide, dentro del genero Entamoeba. Se pueden distinguir dos principales formas de vida en esta especie: el trofozoito y el quiste.

Enterobacterias: Enterobacteriaceae son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos que fermentan la glucosa en anaerobiosis; citocromo oxidasa negativos; reducen los nitratos a nitritos. Cuando son móviles son flagelados peritricos. Son llamadas enterobacterias porque con frecuencia residen en el aparato digestivo de animales y humanos, pero algunas especies tambien viven en la tierra y en el agua.

Enzima: cualquiera de las numerosas sustancias organicas especializadas compuestas por polimeros de aminoacidos, que actuan como catalizadores en el metabolismo de los seres vivos. Con su accion, regulan la velocidad de muchas reacciones quimicas implicadas en este proceso. El nombre de *enzima*, que fue propuesto en 1867 por el fisiologo aleman Wilhelm Kuhne (1837-1900), deriva de la frase griega *en zymē*, que significa 'en fermento'.

Eucariotas (del griego *eu* – bueno, verdadero, *karyon* – núcleo, nuez): organismos caracterizados por poseer células con un núcleo verdadero rodeado por membrana. El registro arqueológico muestra su presencia en rocas de aproximadamente 1.200 a 1.500 millones de años de antigüedad.

Factores de crecimiento: Los factores de crecimiento son un conjunto de sustancias, la mayoría de naturaleza proteica que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular. La función principal de los factores de crecimiento es la del control externo del ciclo celular, mediante el abandono de la quiescencia celular (G₀) y la entrada de la célula en fase G₁. La función de los factores de crecimiento no solo es la de estimular la proliferación celular mediante la regulación del ciclo celular iniciando la mitosis, sino también el mantener la supervivencia celular, estimular la migración celular, la diferenciación celular e incluso la apoptosis. Los factores de crecimiento desempeñan su función a muy baja concentración en los líquidos corporales, del orden de los picogramos. Actúan uniéndose a receptores celulares situados en la membrana celular que transmiten la señal del exterior al interior de la célula, mediante el acoplamiento de diferentes proteinquinas que se fosforilan y que activan una cascada de señales que acaba con la activación de uno o varios genes (transducción de señales).

Fagocitosis: La fagocitosis es la acción de envolver microorganismos, partículas extrañas, restos celulares por células como los neutrófilos y macrófagos (monocitoplasmas). Este es un mecanismo de defensa muy importante, particularmente en infecciones bacterianas. Los neutrófilos y los monocitoplasmas, están equipados con mecanismos dependientes e independientes de Oxígeno para matar a las bacterias. Los mecanismos dependientes de Oxígeno, incluyen el sistema de mieloperoxidasa (MPO) y otros sistemas que involucran la generación de radicales libres derivados del Oxígeno. Los mecanismos independientes de Oxígeno, utilizan cambios de pH en los fagosomas y lisosomas para destruir a los patógenos. En conjunto el MPO es el más potente antibacteriano celular. Después de la fagocitosis, la NADPH oxidasa localizada en la membrana del leucocito convierte el oxígeno molecular en el radical superóxido. El rápido consumo de oxígeno molecular que acompaña la formación del superóxido se denomina "explosión respiratoria". Después el superóxido es transformado en peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa.

Fagocito (del griego *phagos* = comilon, *kytos* = célula): literalmente "célula comilona" deriv **fagocitosis**, forma de endocitosis en la cual la célula rodea a partículas sólidas, bacterias o virus que son introducidas para su destrucción.

Fluorescencia: Es la propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a radiaciones del tipo ultravioleta, rayos catódicos o rayos X. Las radiaciones absorbidas (invisibles al ojo humano), son transformadas en luz visible, o sea, de una longitud de onda mayor a la incidente. En el proceso, una molécula absorbe un fotón de alta energía, el cual es emitido como un fotón de baja energía (mayor longitud de onda). La diferencia de energía entre la absorción y la emisión, es disipada como calor (vibraciones moleculares). Todo el proceso es muy corto (millonesimas de segundo) y este tiempo es la principal diferencia con otro conocido fenómeno luminoso, la fosforescencia.

Galactosa: La lactosa es un disacárido formado por glucosa y galactosa. La idea original fue que en ese tejido la glucosa debía ser un precursor de la galactosa. Con las técnicas de esa época y siendo la glándula mamaria un tejido complejo, los primeros resultados fueron confusos. El Dr. Leloir buscando simplificar el problema utilizó células de levadura común cultivadas en presencia de galactosa. De esta forma pudieron en poco tiempo aislar dos nuevas coenzimas, una estable al calor y otra sensible. La primera de ellas resultó ser glucosa 1,6 difosfato, que actúa como coenzima de una importante etapa de la glucólisis catalizada por la fosfoglucomutasa.

Glucógeno: El glucógeno, reserva de glucosa en los animales, se almacena principalmente en hígado y músculo. Su conversión a glucosa-6-fosfato (G6P) para entrar a la glucólisis, es catalizada en parte por la glucógeno fosforilasa, el camino inverso *i.e.* la síntesis, se lleva a cabo por la glucógeno sintasa. Estas enzimas están reguladas recíprocamente a través de reacciones de fosforilación/defosforilación, este proceso es el resultado de una cascada de fosforilación que responde a los niveles de glucagón y epinefrina a través del CAMP. El glucógeno representa la principal forma de almacenamiento de carbohidratos tanto en animales como en las plantas. Cuando existe una disminución significativa de glucosa en sangre, el glucógeno es degradado.

por medio de una serie de enzimas para cubrir las necesidades energéticas de nuestro organismo. Las glucogenosis son enfermedades en donde existen deficiencias congénitas de la mayoría de las enzimas relacionadas con el metabolismo del glucógeno, en donde los órganos más afectados son el hígado y el músculo esquelético.

Glucosa: Molécula ($C_6H_{12}O_6$) es una aldohexosa (aldehído pentahidroxilado) y un monosacárido. La glucosa es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza. Es la fuente principal de energía de las células, mediante la degradación catabólica, y es el componente principal de polímeros de importancia estructural como la celulosa y de polímeros de almacenamiento energético como el almidón, es encontrada en las frutas y en la miel.

Glutaraldehído: Fue descubierto por David Domingo Sabatini, científico y médico argentino, quien encontró que esta sustancia se encarga de preservar las células, posibilitando su análisis en el microscopio un mayor lapso de tiempo.

Microtúbulos (del latín *mikros* - pequeño, *tubus* - caño, conducto) Conducto hueco, estrecho y alargado de unos 25 nm de diámetro. Se compone de dos subunidades de proteínas que se alternan a lo largo del mismo, y, entre otras funciones, mueven a los cromosomas en la división celular y proporcionan la estructura interna de cilios y flagelos.

Organelos (del griego *organon* - herramienta). Estructuras subcelulares que realizan determinadas funciones (generalmente están rodeadas por membranas y se las encuentra en las células eucariotas) p.ej., mitocondrias, cloroplastos, núcleo.

Pared celular: Estructura producida por algunas células por fuera de la membrana celular, químicamente compuesta por quitina (hongos), peptidoglicano (bacterias) o celulosas (plantas).

Percoll: Se trata de una suspensión de partículas (5-15 μ m) de ácido silícico revestidas de un derivado de polivinilo (polivinilpirrolidona, PVP) que presenta baja viscosidad a densidades altas, no afecta prácticamente a la presión osmótica del medio y es estable a pH comprendidos entre 5 y 10. Es soluble en solución acuosa y estable en ellas siempre que no haya aniones bivalentes (sulfato), especialmente a bajos pH. Este compuesto es el único útil para la separación de microalgas marinas, ya que el percoll es estable en cualquier proporción de agua marina, a diferencia del resto de los posibles solutos utilizables para la separación de algas por gradiente de densidad. El compuesto puede ser utilizado para centrifugaciones zonales, preformando gradientes, o bien para centrifugación isopícnica, ya que la centrifugación de percoll en rotores angulares durante 20-30 minutos y 20,000-100,000g produce un ligero gradiente, independientemente de la densidad inicial del percoll.

Polímero(del griego *polys* - muchos, *meros* - parte) Molécula compuesta por muchas subunidades idénticas o similares.

Pseudopodos del griego *psendes* - falso, *podas* - pie

Purina (del griego *purmos* = centellante, igneo) base nitrogenada formada por dos anillos, la adenina y la guanina son purinas componentes del ADN y el ARN

Quitina (del griego *chiton* – tunica) Es el constituyente esencial de la pared celular de grandes grupos de hongos (basidiomicetos, ascomicetos y zigomicetos) La unidad de la quitina es la N-acetilglucosamina estos monómeros están unidos entre sí igual que la glucosa en la celulosa- mediante uniones β 1,4 glucosídicas También forma esqueleto externo de los artrópodos y otros grupos animales

Quimiósmosis El proceso por el cual se forma el ATP en la membrana interna de la mitocondria El sistema transportador de electrones transfiere protones del compartimento interno al externo, a medida que los protones fluyen nuevamente hacia el compartimento interno la energía del movimiento es usada para agregar fosfato al ADP para formar ATP

Ribosomas: Pequeñas organelas, compuestas de ARNr (r por ribosómico) y proteínas Están presentes en el citoplasma de procariotas (70s) y eucariotas (80s) Son el sitio de la síntesis proteica Esta compuesto de dos subunidades Los ribosomas de las organelas eucariotas (mitocondrias y cloroplastos) tienen 70 S, es decir son similares a los de los procariotas

RNA (ácido ribonucleico) Ácido nucleico formado por una cadena polinucleotídica Su nucleótido, consiste en una molécula del azúcar ribosa, un grupo fosfato y una de estas cuatro bases nitrogenadas adenina, uracilo, citosina y guanina

RNA ribosómico : Uno de los tres tipos de ARN el ARNr es un componente estructural de los ribosomas Son el "core" (parte principal) de los ribosomas y posiblemente la clave del mecanismo de traducción de las proteínas Su estudio comparativo llevó a postulación de un Arbol Filogenético Universal

Simbiosis (del griego *syn* junto, con, *biosis* vivir) Asociación entre dos o más organismos de diferentes especies Incluye 1) mutualismo donde la asociación es beneficiosa para ambos 2) comensalismo donde uno se beneficia y el otro no es dañado ni beneficiado 3) parasitismo uno se beneficia y el otro es dañado

Vacuolas (del latín *vacuus* = vacío) espacio o cavidad citoplasmática, rodeada por una membrana, que se observa en células animales y vegetales que remueven productos de desechos y almacenan alimentos ingeridos Parte de los compartimentos lisosómicos de la célula

Vesícula (del latín *vesicula* = pequeña vasija) pequeño saco intracelular rodeado por una membrana

