

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“MORFOGÉNESIS DE LA PARED CELULAR Y PROPIEDADES BIOFÍSICAS  
DE *Entamoeba histolytica* DURANTE SU DIFERENCIACIÓN”

Por

**ARALIA LEÓN CORIA**

Como requisito para obtener el Grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
con acentuación en Microbiología

Agosto, 2012.

“MORFOGÉNESIS DE LA PARED CELULAR Y PROPIEDADES BIOFISICAS  
DE *Entamoeba histolytica* DURANTE SU DIFERENCIACIÓN”

Comité de Tesis

---

Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta  
Director

---

Dra. María Porfiria Barrón González  
Secretario

---

Dra. María Eufemia Morales Rubio  
1<sup>er</sup> Vocal

---

Dr. Fermín Mar Aguilar  
2<sup>do</sup> Vocal

---

Dr. Feliciano Segovia Salinas  
3<sup>er</sup> Vocal

## **DEDICATORIAS**

A mis padres José Luis León de la Luz y Roció Coria Benet por seguir siendo para mí el más grande ejemplo de superación, perseverancia, trabajo y cariño; porque cada paso que doy en esta vida ha sido por y con ellos. Porque aun estando lejos siempre me han dejado sentir su amor y confianza. Pero sobre todo por su apoyo infinito.

A mi hermana Danira por todos estos años de complicidad, apoyo, de risas y distracciones, por sus regaños y su compañía.

A mis amigos y amigas; tanto a los que conservo desde hace muchos años atrás y a pesar de no estar físicamente conmigo seguimos compartiendo logros y satisfacciones. Así como también a las grandes amigas que he hecho estos últimos años, porque con su apoyo, compañía y amistad sincera han hecho mi paso por la maestría una de las mejores etapas de mi vida.

A los doctores, tanto a los que formaron parte de mi comité de tesis como a los que sin pertenecer a ésta me mostraron su apoyo desinteresado, me animaron a seguir adelante y me aconsejaron cuando lo necesite.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que nada quisiera agradecer a mis padres José Luis León de la Luz y Rocío Coria Benet, ya que sin su cariño, apoyo y ejemplo nada de esto hubiera sido posible.

A mi hermana Danira por ser mi compañía, por escucharme y apoyarme todo este tiempo.

A mis amigos y amigas que estuvieron presentes para mostrarme su apoyo siempre que lo necesité.

A mi director de tesis Dr. Mario Morales Vallarta por confiar en mí para realizar este proyecto, por todo su apoyo y sus consejos.

A la Dra. María Porfiria Barrón González por haberme enseñado a trabajar en el laboratorio, y por todos sus consejos acertados y observaciones.

Al Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo por su amistad, por todo el tiempo invertido para el desarrollo de esta tesis, porque sin su ayuda esta tesis no hubiera sido posible y por toda su paciencia y su enorme apoyo hacia mi persona.

Al Dr. Javier Vargas Villareal del laboratorio de bioquímica y fisiología celular del CIBIN por prestarnos sus instalaciones para el desarrollo de la parte experimental de esta tesis, así como también al Dr. Benito Mata Cárdenas por todo su apoyo desinteresado y sus consejos durante el desarrollo de la parte experimental.

Al IFI Eduardo Ortega Aguilar del laboratorio de fuerza atómica del ITESM por su ayuda en el AFM y los cálculos y estadísticos.

A la Dra Pilar Carranza Rosales del laboratorio de biología celular y molecular del CIBIN por apoyarnos en la última parte experimental de esta tesis.

Al Dr. Jorge Luis Hernandez Piñero por su ayuda en la obtención de imágenes en SEM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico #44144.

A la subdirección de posgrado de esta facultad por todas las facilidades otorgadas.

## **LUGAR DE TRABAJO**

Este trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de biología celular del de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FCB-UANL). También se contó con el apoyo del laboratorio de bioquímica y fisiología celular y del laboratorio de biología celular y molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS), así como del Centro de Innovación, Investigación y Desarrollo en Ingeniería y Tecnología de la UANL (CIIDIT-UANL) y del laboratorio de microscopía de fuerza atómica del departamento de física del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM).

## TABLA DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIAS</b> .....	III
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	IV
<b>LUGAR DE TRABAJO</b> .....	V
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	X
<b>NOMENCLATURA</b> .....	XI
<b>RESUMEN</b> .....	XII
<b>ABSTRACT</b> .....	XIII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	3
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	4
3.1. <i>Entamoeba histolytica</i> .....	4
3.2. Epidemiología y patogenia de la amibiasis .....	5
3.3. Morfología y biología de <i>E. histolytica</i> .....	7
3.3.1. Trofozoíto .....	7
3.3.2. Prequiste .....	8
3.3.3. Quiste .....	9
3.3.4. Metaquiste .....	9
3.3.5. Trofozoíto metaquístico .....	9
3.4. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .....	10
3.5. Formación de la pared quística de <i>E. histolytica</i> .....	13
3.6. Enquistamiento axénico <i>in vitro</i> de <i>E. histolytica</i> .....	16
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	18
4.1. Objetivo general	
4.2. Objetivos específicos	
<b>5. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	19
<b>6. MATERIAL Y METODOS</b> .....	20
6.1. Origen de los reactivos .....	20
6.2. Material biológico .....	21
6.3. Medio de cultivo PEHPS .....	21
6.4. Preparación de soluciones .....	22

a) Acetona al 30%	22
b) Acetona al 50%	22
c) Acetona al 70%	22
d) Acetona al 90%	22
e) Ácido clorhídrico 0.1 N	22
f) Azul de toluidina	22
g) Buffer de cacodilatos de sodio	22
h) Buffer de fosfatos 0.2 M	22
i) Buffer salino de fosfatos (PBS)	22
j) Calcofluor M2R 1%	22
k) Dodecil sulfato de sodio 0.15%	23
l) Glutaraldehído 2.5%	23
m) Hidróxido de sodio 10 N	23
n) Resina epóxica	23
o) Tetraóxido de osmio	23
6.5. Mantenimiento de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	23
6.6. Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i>	24
6.7. Obtención de estructuras quísticas (EQ) de <i>E. histolytica</i>	24
6.8. Prueba de viabilidad de EQ	24
6.9. Fijación de las muestras	25
6.10. Microscopía de fluorescencia (FM)	25
6.11. Microscopía de barrido (SEM)	25
6.12. Obtención de cortes semifinos para su observación en microscopía óptica (OM)	25
6.13. Microscopía de fuerza atómica (AFM)	26
6.13.1. Modo de contacto	26
6.13.2. Modo de no contacto (tapping)	26
6.13.3. Obtención de curvas fuerza-distancia	27
6.13.4. Módulo elástico	27
6.13.5. Trabajo de adhesión	27
6.13.6. Rugosidad	27
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
7.1. Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i> bajo condiciones normales y con alta tensión de CO <sub>2</sub>	28
7.2. Producción de EQ de <i>E. histolytica</i> mediante el método de alta tensión de CO <sub>2</sub>	29
7.3. Microscopía de fluorescencia (FM)	29
7.3.1. Patrón de fluorescencia de estructuras quísticas (EQ)	29
7.3.2. Patrón de fluorescencia de trofozoítos	30
7.3.3. Observación de núcleos de EQ y trofozoítos con DAPI	30
7.4. Cortes semifinos en microscopía óptica (OM)	31
7.4.1. Observación de cortes semifinos de trofozoítos	31
7.4.2. Observación de cortes semifinos de prequistes	31
7.4.3. Observación de cortes semifinos de EQ	32
7.5. Microscopía de fuerza atómica	32
7.5.1. Análisis de imágenes de AFM	32
7.5.2. Imágenes de trofozoítos	33

7.5.3. Dimensiones de EQ y trofozoítos .....	33
7.5.4. Relieve de EQ y trofozoítos .....	34
7.5.5. Homogeneidad de la superficie celular .....	35
7.5.6. Modulo elástico de EQ y trofozoítos .....	36
7.5.7. Trabajo de adhesión .....	38
7.5.8. Rugosidad .....	39
7.6. Microscopía de barrido (SEM) .....	39
7.6.1. Agrupación de EQ .....	39
7.6.2. Morfología celular .....	40
7.6.3. Aparición de microfibrillas en la superficie celular.....	40
<b>8. DISCUSIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>47</b>
<b>10. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Origen de los reactivos utilizados ..... 20

**Tabla 2.** Composición del medio de cultivo PEHPS ..... 21

**Tabla 3.** Rugosidad de los estadios de *E. histolytica* en modo tapping.....39

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig 1.</b> Morfología de <i>E. histolytica</i> .....	10
<b>Fig. 2.</b> Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .....	12
<b>Fig. 3.</b> Modelo “wattle & daub” de la pared quística de <i>E. invadens</i> . .....	15
<b>Fig. 4.</b> Curva de crecimiento de <i>E. histolytica</i> .....	28
<b>Fig. 5.</b> Patrón de fluorescencia de EQ .....	29
<b>Fig. 6.</b> Patrón de fluorescencia de trofozoítos .....	30
<b>Fig. 7.</b> Núcleos de trofozoítos y EQ observados con DAPI .....	30
<b>Fig. 8.</b> Cortes semifinos de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> . .....	31
<b>Fig. 9.</b> Cortes semifinos de prequistes de <i>E. histolytica</i> . .....	31
<b>Fig. 10.</b> Cortes semifinos de EQ de <i>E. histolytica</i> . .....	32
<b>Fig. 11.</b> Imágenes obtenidas en AFM .....	33
<b>Fig. 12.</b> Imágenes de amplitud de trofozoítos. ....	33
<b>Fig. 13.</b> Medición de una EQ4 .....	34
<b>Fig. 14.</b> Medición de un trofozoíto .....	34
<b>Fig. 15.</b> Relieve de la superficie celular de una EQ4 .....	35
<b>Fig. 16.</b> Relieve de la membrana de un trofozoíto .....	35
<b>Fig. 17.</b> Diferencia en la homogeneidad de la superficie de una EQ3 .....	36
<b>Fig. 18.</b> Homogeneidad de la superficie celular de trofozoítos y EQ4 .....	36
<b>Fig. 19.</b> Módulo elástico del trofozoíto .....	37
<b>Fig. 20.</b> Módulo elástico de una EQ4 .....	37
<b>Fig. 21.</b> Trabajo de adhesión del trofozoíto .....	38
<b>Fig. 22.</b> Trabajo de adhesión de una EQ4 .....	38
<b>Fig. 23.</b> Morfología celular de <i>E. histolytica</i> en SEM .....	41
<b>Fig. 24.</b> Microfibrillas en la superficie celular de una EQ2 de <i>E. histolytica</i> .....	41

## NOMENCLATURA

<b>AFM</b>	microscopía de fuerza atómica
<b>°C</b>	grados Celsius o centígrados
<b>cél</b>	células
<b>E</b>	módulo elástico
<b>EQ</b>	estructuras quísticas
<i>et al.</i>	y colaboradores
<b>FM</b>	microscopía de fluorescencia
<b>h</b>	horas
<b>g</b>	gramos
<b>mg</b>	miligramos
<b>Lb</b>	libras
<b>L</b>	litros
<b>mL</b>	mililitros
<b>min</b>	minutos
<b>µm</b>	micrometros
<b>N</b>	newtons
<b>nm</b>	nanometros
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OM</b>	microscopía óptica
<b>Pa</b>	pascales
<b>pH</b>	potencial de hidrógeno
<b>prom</b>	promedio
<b>SEM</b>	microscopía electrónica de barrido
<b>Sdev</b>	desviación estandar
<b>UV</b>	luz ultravioleta
<b>W</b>	trabajo

## RESUMEN

*Entamoeba histolytica* es un protozoo parásito que puede invadir la mucosa intestinal y diseminarse por vía hemática. El cuadro clínico producido por *E. histolytica* se conoce como amibiasis o amebiasis, la cual es una enfermedad parasitaria intestinal de tipo alimenticia. De cada 10 personas a quienes les es detectado el parásito, solo una de ellas desarrollará síntomas, los cuales pueden variar desde unas pequeñas diarreas hasta casos más graves.

*E. histolytica* posee dos estadios en su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste. La forma infestiva corresponde al quiste; es una estructura esférica tetranucleada formada por una cubierta de quitina resistente a condiciones adversas.

La diferenciación celular de *E. histolytica* se lleva a cabo en la luz del colon, en condiciones aun no del todo conocidas, durante este proceso el trofozoíto deja de emitir pseudópodos, el núcleo comienza a dividirse, comienzan a formarse estructuras llamadas barras cromatoidales, se pierde la forma irregular característica y la célula toma una forma esférica al tiempo que aparece una pared gruesa llamada pared quística. El cambio de trofozoíto concluye con la formación de un quiste tetranucleado.

Durante este estudio se describen algunos aspectos de la formación de la pared celular quística, así como cambios estructurales que presenta la célula a lo largo de su enquistamiento mediante imágenes de estructuras quísticas (EQ) producidas *in vitro* mediante el método de alta tensión de CO<sub>2</sub>, fijadas en glutaraldehído 2.5% en diferentes tiempos de diferenciación celular y observadas a través de microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fluorescencia (FM), microscopía óptica (OM) y microscopía de fuerza atómica (AFM).

Los resultados aquí obtenidos muestran una clara diferencia entre los estadios que *E. histolytica* presenta en su proceso de diferenciación celular; se evidencia con detalle las diferencias en topología, elasticidad, composición, estructura, rugosidad y tamaño; así como también la aparición de microfibrillas en la superficie externa de la célula, lo cual evidencia la formación de una pared celular.

Todo esto dirigido hacia una mejor comprensión a nivel celular del proceso de diferenciación de *E. histolytica*, lo cual nos brinda nuevos datos, permitiendo un mejor conocimiento del proceso de enquistamiento y la búsqueda de nuevas estrategias encaminadas al control de la amibiasis.

## ABSTRACT

*Entamoeba histolytica* is a protozoan parasite that can invade the intestinal mucosa and produce a clinical setting called amebiasis or amoebiasis, which can be present as an intestinal disease or disseminate to the liver through blood, causing amoebic liver abscess, or to other organs like brain or lungs. For each 10 people infected with this parasite, only one of them will develop symptoms, which can vary from a little diarrhea to a very severe case.

*E. histolytica* has two stages in its life cycle: the trophozoite and the cyst. The infective form corresponds to the cyst, which is a spherical tetranucleated structure covered with a chitin wall that confers its resistance to adverse conditions.

The *E. histolytica* cell differentiation is performed in the colonic lumen under not yet fully known conditions, during this process the trophozoite stops its pseudopodia formation, the nucleus begins to divide, structures called chromatoid bodies begin to form, the cell takes a spherical shape while the cyst wall appears. The change of trophozoite concludes with the formation of a tetranucleated cyst.

During this study some aspects of the cyst cell wall formation as well as structural changes the cell goes through along its encystment are described by images of cystic structures (EQ) produced *in vitro* by the method of CO<sub>2</sub> high pressure, fixed in glutaraldehyde 2.5% during different times of cell differentiation and observed by scanning electron microscopy (SEM), fluorescence microscopy (FM), optical microscopy (OM) and atomic force microscopy (AFM).

The results obtained show a clear difference between the *E. histolytica* stages during the cell differentiation process, we demonstrated in detail the differences in topology, elasticity, composition, structure, roughness and size, as well as the appearance of microfibrils on the outer surface of the cell, which shows the formation of a cell wall.

All this led to a better understanding of *E. histolytica* differentiation, which gives us new data, allowing a better understanding of the process of encystment and the search for new strategies for control of amoebiasis.

## 1. INTRODUCCIÓN

Se han descrito especies del género *Entamoeba* como parásitos naturales del aparato digestivo del hombre, monos y muchas otras especies de huéspedes vertebrados e invertebrados. En la fase de trofozoíto, los miembros de este género se multiplican por fisión binaria. Todos, con excepción de *Entamoeba gingivalis*, tienen una fase quística durante la que se reproducen mediante dos o más divisiones del núcleo en la mayoría de las especies (Beaver y Joung, 2003)

*E. histolytica* es uno de los protozoarios parásitos más primitivos; pertenece al orden Amoebida, de la clase Lobosea, superclase Rhizopoda subphylum Sarcodina, del phylum Sarcomastigophora (Levine *et al.*, 1980).

El cuadro clínico producido por *E. histolytica* se conoce como amibiasis o amebiasis, la cual es una enfermedad parasitaria intestinal de tipo alimenticia. De cada 10 personas a quienes les es detectado el parásito, solo una de ellas desarrollará síntomas, los cuales pueden variar desde unas pequeñas diarreas hasta casos más graves (Samuelson, 1989). De las personas que presentan la enfermedad, entre 80 y 98% manifiestan afección intestinal, y los restantes afección extraintestinal. En los casos sintomáticos la intensidad es muy variable y oscila de casos leves a otros de extraordinaria gravedad; siendo común una sintomatología poco intensa, con anorexia, astenia, dolor abdominal, alteraciones en el tránsito intestinal y diarrea trivial no sanguinolenta (Pumarola *et al.*, 1991).

*E. histolytica* posee dos estadios en su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste. El trofozoíto corresponde a la fase invasiva, habita la luz y la pared del colon y especialmente ciego y recto (Pumarola *et al.*, 1991). Sus dimensiones oscilan entre los 10 y 60  $\mu\text{m}$  aunque es más frecuente encontrarlos de un tamaño entre 15 y 30  $\mu\text{m}$ . El trofozoíto posee solo un núcleo, el cual es esférico y su diámetro es aproximadamente la quinta o sexta parte de la amiba completa (Beaver y Jung, 2003).

La forma infestiva corresponde al quiste; es una estructura esférica tetranucleada formada por una cubierta de quitina que le confiere resistencia a condiciones adversas (Ravdin, 1995).

La diferenciación de amibas del genero *Entamoeba* incluye la formación de una estructura quística rígida y resistente. Debido a que el quiste es la forma infestiva, es de suma importancia el investigar aspectos sobre la formación de la pared celular.

*Entamoeba invadens* y *E. histolytica* son extraordinariamente semejantes, tanto en su proceso de diferenciación como en su ciclo de vida, razón por la cual durante muchos años *E. invadens* sirvió como modelo biológico experimental para el estudio de la diferenciación de *E. histolytica*, dada la dificultad que ha existido para la obtención del enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica*.

A pesar de que el proceso de enquistamiento de *E. histolytica* ha sido estudiado *in vitro* por diversos autores, muchos aspectos sobre este proceso permanecen aun no del todo comprendidos.

El propósito de este trabajo fue describir algunos de los cambios por los que atraviesa *E. histolytica* durante su proceso de diferenciación celular, particularmente algunos aspectos sobre la morfogénesis de la pared del quiste.

## 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la amibiasis es una parasitosis con alta incidencia a nivel mundial en los países en vías de desarrollo, afecta aproximadamente a 50 millones de personas cada año, ocasionando cerca de 10,000 muertes (WHO, 1997), razón por la cual se han llevado a cabo numerosos estudios enfocados hacia el control de dicha enfermedad.

La forma infestiva de *E. histolytica* es el quiste, el cual posee una fuerte pared formada principalmente por quitina, la cual le confiere su resistencia a ambientes adversos.

Este trabajo se enfocó principalmente hacia la descripción de la morfogénesis de la pared del quiste de *E. histolytica* a través de microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía óptica (OM), microscopía de fluorescencia (FM) y microscopía de fuerza atómica (AFM), además de otros aspectos que ocurren durante la diferenciación de *E. histolytica*.

La comprensión de los cambios por los que atraviesa la superficie celular de *E. histolytica* durante la morfogénesis de la pared aportará información útil para la búsqueda de estrategias encaminadas hacia el control de la amibiasis.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. *Entamoeba histolytica*

La forma de trofozoíto de *E. histolytica* fue identificada por primera vez por Lösch en 1875 en las heces de un enfermo con disentería crónica en la ciudad de San Petesburgo, Rusia; aunque Lösch al hacer la autopsia de ese paciente halló los trofozoitos de la amiba en las úlceras del colon y con las heces sanguinolentas inoculó *per rectum* a un perro y le produjo disentería, no llegó a sospechar la relación causa-efecto entre la amiba y la colitis aguda.

Posteriormente las investigaciones llevadas a cabo en El Cairo por Kartulis en 1886 y las llevadas a cabo en Praga por Hlava en 1887 sentaron las bases para que en 1891 Councilman y Lafleur en la ciudad de Baltimore describieran las pruebas anatomopatológicas y clínicas para poder evidenciar la asociación de este parásito con un tipo de disentería y absceso hepático.

En 1893 Quincke y Ross describieron la forma quística de este parásito, y en 1903 Schaudinn le da el nombre de *E. histolytica* debido a su capacidad para lisar tejidos y producir úlceras intestinales; diferenciándola de la amiba común del colon *Entamoeba coli* (Romero, 1994).

Diez años después, Walker y Sellards en las Filipinas obtuvieron pruebas en personas voluntarias de que *E. histolytica* es la causa de colitis amibiana y que *Entamoeba coli* es tan solo un comensal inocuo del intestino grueso. Notaron también que (i) la transmisión es llevada a cabo por los quistes y no por trofozoitos, (ii) que existían portadores asintomáticos que podrían ser responsables de la transmisión del protozoario, y (iii) que hay diferencias en la susceptibilidad de cada individuo para padecer la enfermedad.

El concepto de que *E. histolytica* comprendía dos especies morfológicamente idénticas, una no patógena y otra patógena responsable de la amebiasis invasiva fue propuesta por Brump en 1925, nombrando *Entamoeba dispar* a la amiba no patógena, y *Entamoeba dysenteriae* a la que presentaba patogenicidad.

En 1925 Boeck y Drbohlav fueron los primeros en cultivar exitosamente a *E. histolytica* usando el medio de suero-huevo de Locke. Otros medios frecuentemente utilizados para cultivar cepas patógenas fueron los descritos por Balamuth y Jones en 1946; sin embargo, el primer medio para el cultivo axénico fue desarrollado por Diamond en 1961, y perfeccionado por él mismo en 1986. Las técnicas de cultivo han ayudado enormemente a la comprensión y estudio de *E. histolytica*.

*E. histolytica* se ha encontrado en todas las poblaciones del mundo en las que ha sido buscada. Es más frecuente en los trópicos y zonas subtropicales que en los climas fríos, pero en las poblaciones carentes de higiene de las zonas templadas y subárticas la frecuencia de esta parasitosis es tan elevada como en los trópicos.

### **3.2. Epidemiología y patogenia de la amibiasis**

La infección por el protozoario *E. histolytica* se encuentra en todo el mundo, desde climas muy fríos hasta zonas tropicales (Petri, 1993). Se ha estimado que aproximadamente 480 millones de personas, o el 12% de la población mundial, están infectadas y que la mortalidad anual puede alcanzar los 110,000 personas (Gerrant, 1986). Después de la malaria, causada por *Plasmodium*, es posible que *E. histolytica* sea la segunda causa de muerte por protozoarios en el mundo (Kucik, 2004).

Se presenta más en varones adultos y está muy influenciada por el nivel higiénico-económico de la población (Pumarola, 1991).

Por su mecanismo de transmisión la amibiasis pertenece al grupo de las protozoosis transmitidas por fecalismo, ya que los quistes se ingieren al llevar a la boca bebidas, alimentos, manos o fomites que contengan materiales fecales de personas parasitadas con la amiba, con sintomatología o sin ella (Romero, 1993). La transmisión de *E. histolytica* por agua contaminada es común en países

subdesarrollados donde la mayoría del agua para consumo humano no es tratada. El uso de heces humanas como fertilizante es también una fuente importante de infección (Markell *et al.*, 1986).

El daño producido por *E. histolytica* se debe principalmente a la acción de sus enzimas, tales como mucinasa, hialuronidasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, etc., las cuales lisan los tejidos y permiten la invasión de órganos, aparatos y sistemas del hospedero. Otro mecanismo causante de daño es la eritrofagia, en el cual el trofozoíto introduce eritrocitos que posteriormente son destruidos en el citoplasma amibiano. El tercer mecanismo de daño es el traumatismo directo tisular que ejercen los trofozoítos al golpear directa y constantemente los tejidos, separando unas células de otras (Romero, 1993).

La adherencia intestinal se realiza fundamentalmente con las células del epitelio de descamación. Como consecuencia de la adherencia las células del epitelio se lisan, destrucción que es potenciada por la fagocitosis que realiza la propia amiba. La penetración se realiza con la intervención de las enzimas líticas como las proteasas, mucopolisacaridasas entre otras, y con la ayuda del propio movimiento amebiano (Leippe, 1994). El daño intestinal es más frecuente a nivel de ciego y recto sigmoides, ya que en estos sitios el tránsito intestinal es menor y con ello se concentra mayor número de trofozoítos, algunos de los cuales llegan a invadir las paredes (Petri, 1993). Este parásito puede emigrar a zonas adyacentes del intestino y provocar una intensa reacción inflamatoria y dar lugar así a un ameboma (Pumarola, 1991).

Existen casos de amibiasis extraintestinal, donde los trofozoítos entran a torrente circulatorio a través del sistema portal, pudiendo llegar a cualquier parte del organismo, especialmente al hígado, dando lugar a una amebiasis extraintestinal. Al alcanzar el hígado, las amibas producen inicialmente una reacción inflamatoria con posterior necrosis tisular y formación de uno o varios abscesos. Otras formas de amebiasis extraintestinal suelen ser originados de abscesos hepáticos, los cuales se abren directamente al pulmón, pleura o pericardio, o por vía hemática al pulmón, cerebro, etc. (Pumarola, 1991).

Incluso en las comunidades en que la infección por amibas es hiperendémica, ciertos individuos escapan o resisten la infección. Puede existir inmunidad a *E. histolytica*, pero no se ha demostrado de forma concluyente. Indudablemente, algunos portadores asintomáticos son capaces de desarrollar una tolerancia considerable a este parásito, y es posible que los indígenas de zonas endémicas lleguen a desarrollar cierta inmunidad a las cepas locales. La recuperación de una amibiasis no confiere inmunidad frente a la reinfección, y las personas que se curan espontáneamente vuelven a ser susceptibles al cabo de más o menos un año (Beaver *et al.*, 1956).

Han sido descrito diversos factores de virulencia que son importante para la patogénesis del parásito, sin embargo, la gran mayoría de los mecanismos moleculares que utiliza el parásito para desarrollar una enfermedad invasiva permanecen aún desconocidos (Stanley, 2003).

### **3.3. Morfología y biología de *E. histolytica***

El ciclo de vida de *E. histolytica* fue descrito por primera vez en 1928 por Dobell, e incluye los estadios de trofozoíto, prequiste, quiste, metaquiste y trofozoíto metaquístico. Fue hasta 1988 que Lushbaugh y Miller describieron la ultraestructura de *E. histolytica* gracias a imágenes obtenida en el microscopio electrónico de transmisión.

#### **3.3.1. Trofozoíto**

El trofozoíto, o forma móvil, puede variar en tamaño, desde los 12 y 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, y más frecuentemente 15 y 30  $\mu\text{m}$ . Las formas más grandes pueden deberse a un aumento en la actividad celular por el aumento en el contenido de DNA y RNA en la amiba (Huber *et al.*, 1989). Las formas más pequeñas corresponden a las no invasivas, y se encuentran habitualmente en los casos asintomáticos, en contraste con las formas invasivas que son de mayor tamaño y que no aparecen en la luz intestinal ni poseen en el endoplasma restos celulares o hematíes (Pumarola, 1991).

El trofozoíto es extraordinariamente pleomórfico, ya que su aspecto y movilidad son influenciados por varios factores como son: los cambios de pH, potencial redox y la osmolaridad. Dependiendo de las condiciones del ambiente, la motilidad y la formación de pseudópodos puede ser rápida y unidireccional, sin embargo, generalmente sus movimientos no siguen un patrón en línea recta. El trofozoíto se multiplica por fisión binaria y es muy sensible a los jugos gástricos y a los agentes externos. Su hábitat comprende la luz y la pared del colon y especialmente ciego y recto (Pumarola, 1991).

El trofozoíto presenta una membrana citoplasmática dividida en dos porciones: una externa llamada ectoplasma, y una porción interna denominada endoplasma (Petri, 1993). El ectoplasma, que es la pared periférica del trofozoíto, es hialino, retráctil y carece casi por completo de granulaciones (Pumarola, 1991). Los pseudópodos son prolongaciones del ectoplasma y le proporcionan al parásito una movilidad de aproximadamente 50  $\mu\text{m}/\text{seg}$  (Romero, 1993).

El endoplasma tiene una estructura granular fina y, en las formas mayores, abundantes vacuolas y vesículas que contienen restos celulares y hematíes intactos o en vía de degradación (Pumarola, 1991).

El núcleo tiene forma esférica y representa generalmente entre una quinta y una sexta parte del tamaño del trofozoíto, posee un cúmulo de cromatina pequeño y puntiforme en el centro encerrados en una cápsula llamado cariosoma o endosoma (Petri, 1993). Presenta cromatina adherida a la cara interna de la membrana celular, distribuida en forma más o menos homogénea (Romero, 1993), (ver Fig.1, imagen A).

### **3.3.2. Prequiste**

En el estadio de prequiste, el trofozoíto disminuye su tamaño hasta alcanzar casi el mismo que el quiste. En el citoplasma ya no se observan inclusiones fagocíticas, pero usualmente contiene depósitos difusos de glucógeno y ocasionalmente cuerpos cromatoides. Los cuerpos cromatoides están compuestos por ribosomas. La forma prequística es uninucleada y el núcleo se observa de gran tamaño (Proctor and Gregory, 1973), (ver Fig.1, imagen B).

### **3.3.3. Quiste**

El quiste se forma por la evolución de la forma prequística, donde se comienza a formar una pared quística para formar un quiste tetranucleado. Los quistes jóvenes tienen 1 ó 2 núcleos, algunos cuerpos cromáticos y vacuolas de glucógeno. El quiste madura por dos divisiones mitóticas consecutivas del núcleo que dan lugar a cuatro núcleos, cada uno de los cuales es una réplica en miniatura del núcleo original al iniciar el enquistamiento. Durante este proceso de maduración se consume el glucógeno y los cuerpos cromatóides se hacen menos visibles o desaparecen por completo. Los cuerpos cromáticos o cromatóides contienen principalmente ácidos nucleicos y fosfatos. Solo los quistes maduros son infecciosos (Pumarola, 1991).

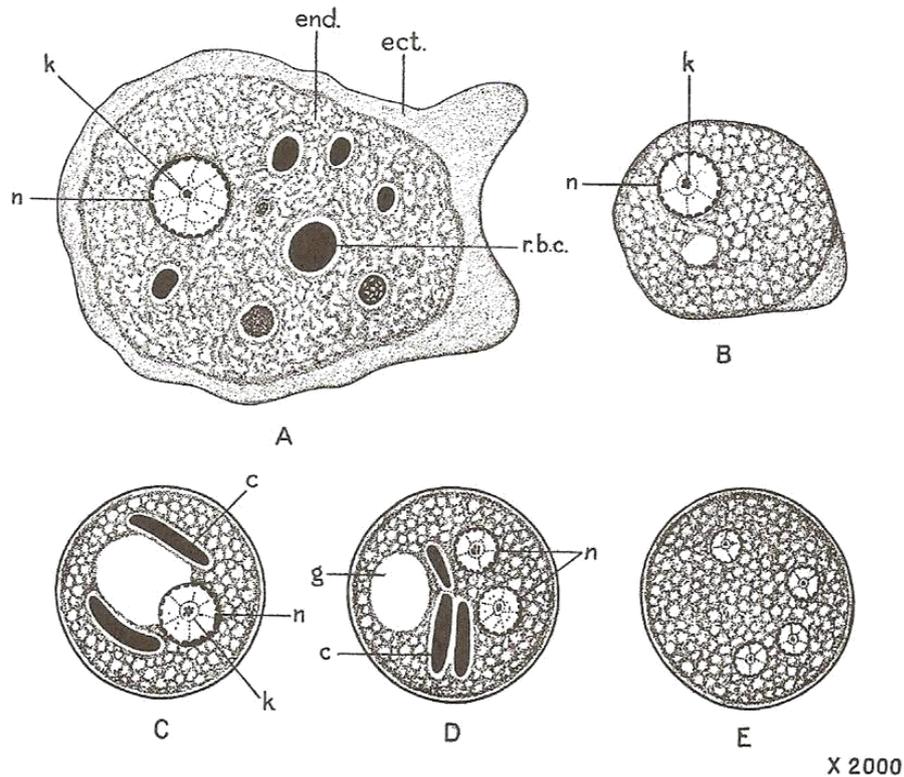
El quiste es redondo u oval con un tamaño que oscila entre 10 y 25  $\mu\text{m}$  de diámetro. Dentro de la membrana nuclear esta uniformemente distribuida cromatina periférica. El cariosoma es pequeño y usualmente localizado en el centro de los núcleos. El quiste posee una pared de 0.6  $\mu\text{m}$  y es resistente al jugo gástrico y factores ambientales externos adversos (Pumarola, 1991), (ver Fig.1, imagen E).

### **3.3.4. Metaquiste**

Durante el proceso de desenquistamiento, la amiba tetranucleada comienza a volverse activa, separándose de la pared celular. La amiba tetranucleada escapa de la pared quística a través de un pequeño poro (ver Fig.1, imagen C y D).

### **3.3.5. Trofozoito metaquístico**

Ya fuera del quiste, los núcleos dentro de la amiba tetranucleada empiezan a separarse y se dividen hasta formar ocho trofozoitos metaquísticos uninucleados, Estos trofozoitos miden alrededor de 8  $\mu\text{m}$  y comienzan a alimentarse y crecer para finalmente llegar a su tamaño normal (Pumarola, 1991).



**Fig 1.** Imagen de la morfología de *E. histolytica*, en la cual se observa: **A) trofozoíto:** pleomórfico, su tamaño es de 15-30  $\mu\text{m}$ , se multiplica por fisión binaria, habita la luz y pared del colon; especialmente el ciego y el recto, **B) prequiste:** la ameba deja de emitir pseudópodos, toma una forma redondeada, comienza a formar vacuolas de glucógeno y el ectoplasma desaparece, **C) prequiste inmaduro uninucleado:** aparecen cuerpos cromatoides y se forma la pared quística, **D) quiste inmaduro binucleado:** los núcleos se encuentran en división y aparecen más cuerpos cromatoides, **E) quiste maduro:** tetranucleado, redondo de 10-25  $\mu\text{m}$ , sin cuerpos cromatoides, presenta pared celular la cual le confiere la capacidad de resistir los factores externos adversos y este estadio representa la fase infestiva.

c=cuerpos cromatoides; ect=ectoplasma; end= endoplasma; g=vacuola de glucógeno; k=cariosoma; n=nucleo; r.b.c.=eritrocitos. (Imagen tomada de Parasitología Clínica, Beauver y Jung , 2003).

### 3.4. Ciclo de vida de *E. histolytica*

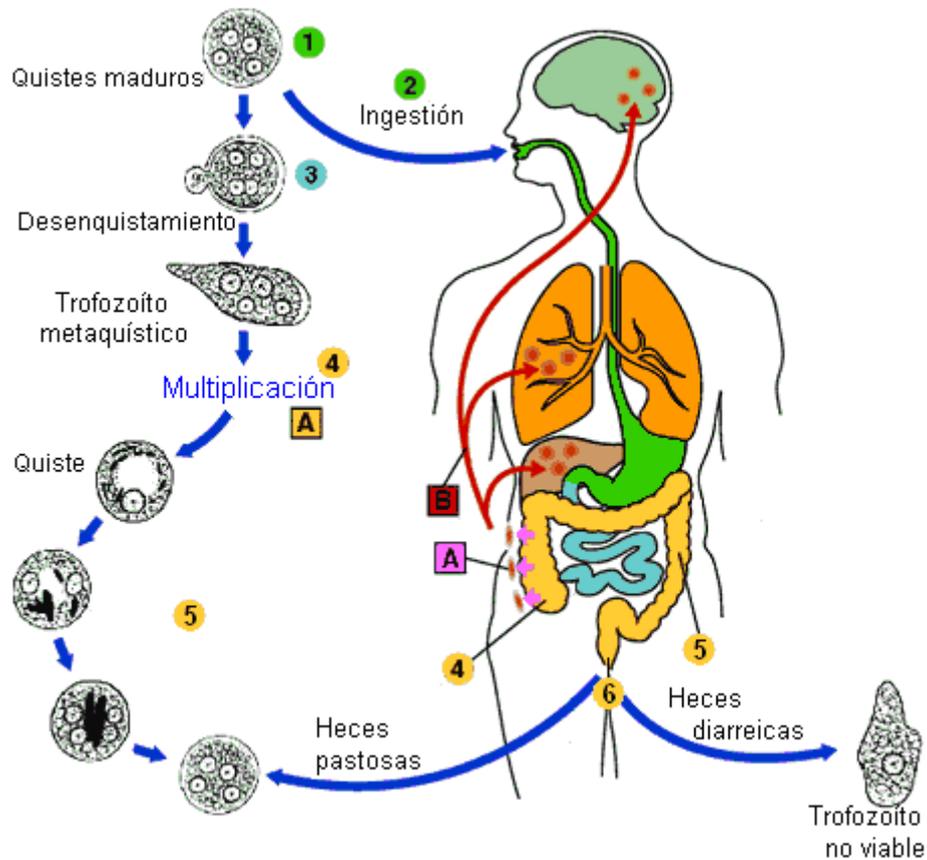
Cuando en el medio ambiente se presentan condiciones no propicias para el trofozoíto, este empieza a cambiar de forma, deja de emitir pseudópodos, el endoplasma y ectoplasma ya no se diferencian, casi desapareciendo el último, se pierde la forma irregular característica y la célula toma una forma esférica, al tiempo

que aparece una pared gruesa llamada pared quística (Petri, 1993). Mientras sucede lo anterior, la célula empieza a formar material de reserva en forma de vacuolas de glucógeno y barras cromatoidales. La diferenciación del trofozoíto concluye con la formación de un quiste tetranucleado (Romero, 1993).

Los quistes son eliminados a través de las heces y la infección ocurre por la ingesta de agua o alimentos contaminados con el quiste maduro de *E. histolytica* o a través del sistema mano-ano-boca que consiste en la transmisión del quiste a través de manos contaminadas con materia fecal. El quiste maduro desciende en el tubo digestivo hasta llegar al intestino, donde previo contacto con jugos digestivos, se inicia el proceso de desenquistamiento, en el cual la pared quística de resistencia se reblandece, los núcleos se duplican a ocho y finalmente se liberan pequeñas formas trofozoíticas llamadas amébulas metaquísticas, las que crecen a trofozoítos maduros que migran hacia el intestino grueso.

Gracias a la protección que les confieren sus paredes, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el ambiente exterior y son responsables de la transmisión de la infección. Los trofozoítos también pueden ser expulsados mediante la diarrea, pero son rápidamente destruidos una vez que salen del organismo, y si son ingeridos no sobreviven la exposición al ambiente gástrico (Clark, 1992).

En muchos casos, los trofozoítos se mantienen en el lumen intestinal (amibiasis no invasiva) de los individuos que son portadores asintomático, eliminando quistes en las heces. Mientras que en otros pacientes los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (amibiasis intestinal), o a través del flujo sanguíneo, sitios extraintestinales como hígado, cerebro y pulmones (enfermedad extraintestinal), resultando en manifestaciones patológicas graves (Romero, 1993), (ver Fig.2).



**Fig.2. Ciclo de vida de *E. histolytica*.** 1.-Quiste tetranucleado maduro. 2.- Ingestión del quiste tetranucleado maduro. 3.- Desenquistamiento, el cual ocurre en la región del íleon terminal, en este proceso se libera un trofozoito metaquístico tetranucleado. 4.- Multiplicación a nivel de colon proximal en el cual el trofozoito metaquístico tetranucleado se multiplica por fisión binaria originando cuatro trofozoitos, los cuales inmediatamente vuelven a dividirse originando ocho trofozoitos mononucleados. 5.- Enquistamiento a nivel de colon distal, donde un trofozoito se transforma en un quiste. 6.- Eliminación de los quistes a través de las heces pastosas y de trofozoitos a través de heces diarreas. En algunos pacientes los trofozoitos invaden la mucosa intestinal, produciendo una colitis sintomática (A enfermedad intestinal) o, a través del torrente sanguíneo, a sitios extraintestinales dando lugar a la aparición de abscesos en el hígado, el cerebro y los pulmones (B enfermedad extraintestinal) (Imagen basada en el esquema de [www.CDC.com](http://www.CDC.com)).

### 3.5. Formación de la pared quística de *E. histolytica*

El enquistamiento es un proceso complejo que incluye cambios intracelulares, el consumo de reservas de glucógeno, la formación de agregados ribosomales, cambios en la expresión génica y transcripción, síntesis de proteínas y la formación de una pared quística (Eichinger, 2001). Esta pared quística está formada de un homopolímero de N-acetilglucosamina (GlnNAc) unidos por enlaces  $\beta(1-4)$ , lo cual le confiere resistencia a agentes externos que pudieran dañar a la célula, facilitando así la sobrevivencia y diseminación del parásito (Chávez *et al.*, 2007).

Gracias a imágenes de quistes de *E. invadens* obtenidas por fluorescencia y adicionadas con calcofluor M2R, el cual posee afinidad por polímeros de glucosa, se pudo estudiar morfológicamente el proceso de enquistamiento. De acuerdo a estos estudios los quistes se forman de la siguiente manera: (i) primeramente se deposita el polisacárido fibrilar en la membrana del trofozoíto, (ii) después se comienza a formar el quiste en el interior del mismo, y por último, (iii) se libera el quiste mediante degradación parcial de la membrana del trofozoíto que le dio origen. (Arroyo *et al.*, 1978).

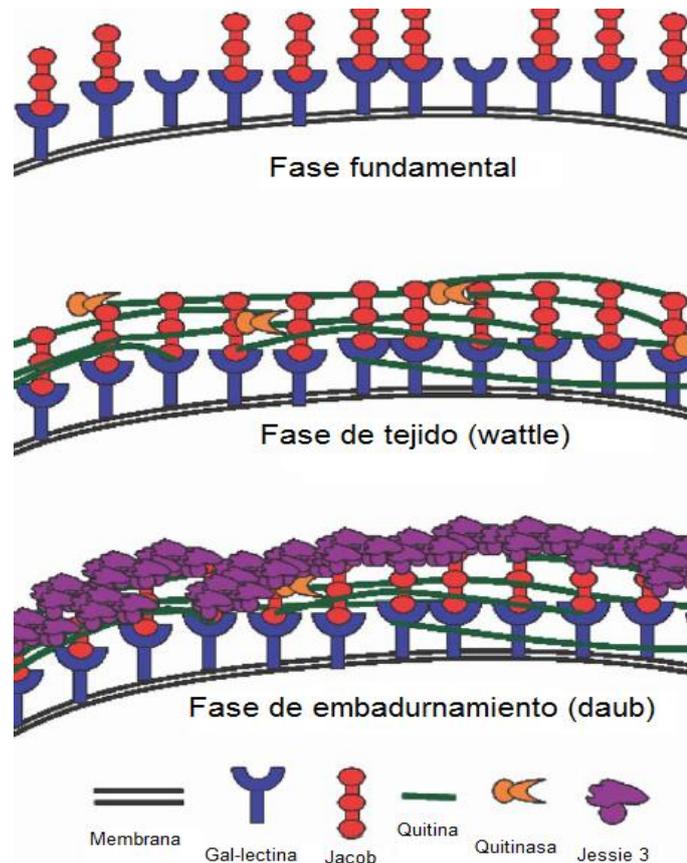
La pared del quiste mide entre 0.125 y 0.150  $\mu\text{m}$  de grosor (Chávez, 1978) y está compuesta por microfibrillas que se encuentran entrelazadas y distribuidas al azar dispuestas en varias capas concéntricas hasta llegar a formar una gruesa malla (Martínez y Espinosa, 2003).

Durante el enquistamiento de *Giardia lamblia*, se ha observado q la actividad de cinco enzimas responsables de la síntesis de N-acetilglucosamina, principalmente la glucosamina-6-fosfoisomerasa (Gln6Pi) (Macechko *et al.*, 1992), la cual inicia la conversión de fructosa-6-fosfato a glucosamina-6-fosfato, la cual es el sustrato para una serie de reacciones que terminan en la formación de polímeros de N-acetilglucosamina, las cuales son el principal componente de la quitina. Se cree que la misma ruta en *Entamoeba histolytica* debe ser muy similar a la reportada en *G. lamblia* (Jarroll *et al.*, 2001).

A pesar de que no se ha encontrado rastros ni de quitina sintetasa ni de quitinasa presentes en el trofozoíto, ambas enzimas son expresadas por los quistes de este parásito (Campos-Góngora *et al.*, 1997). Se ha observado que las quitinasas de *E. histolytica* poseen dominios catalíticos semejantes a los encontrados en quitinasas de nematodos, insectos y plantas, y están presentes en cientos de pequeñas vesículas secretorias en el quiste (Shen y Jacobs, 1999).

Estudios en espectrometría de masas han demostrado que además de quitina, la pared de *E. invadens* contiene tres familias de lectina llamadas Jacob, Jessie3 y quitinasas, las cuales contienen uno o más dominios de unión a quitina ricos en cisteína que son únicos en el género *Entamoeba* (Van Dellen, 2002).

Recientemente se realizó un estudio en *E. invadens* con marcadores de inmunofluorescencia, donde se demostró que la quitina se forma en vesículas secretoras previo a su disposición en la superficie del prequiste. Se observó también que tanto las lectinas Jacob, que tienen un arreglo tipo tándem de sus dominios de unión a quitina, como las quitinasas, que tienen un dominio N-terminal de unión a quitina, son producidas tempranamente durante el enquistamiento, razón por la cual juegan un papel importante en el entrecruzamiento de las fibrillas de quitina y la estructura de la pared del quiste. Las lectinas Jessie3 se forman en procesos posteriores del enquistamiento y parecen jugar un papel importante en la pérdida de permeabilidad de la pared quística. Todo esto apoya el modelo hipotético “wattle & daub” para la formación de la pared celular de *Entamoeba*, donde los entretejidos (fibrillas de quitina entrecruzadas con lectinas Jacob) son formadas antes del embadurnamiento de las lectinas Jessie3 (Anirban *et al.*, 2009), (ver Fig.3).



**Fig.3. Modelo “wattle & daub” de la pared quística de *E. invadens* (hipótesis).** En la fase fundamental de enquistamiento, las lectinas Jacob, que son glicoproteínas que contienen Gal, están unidas a la superficie de la amiba en el proceso de enquistamiento mediante las Gal-lectinas que son constitutivamente expresadas en la membrana plasmática. En la segunda fase (fase de tejido o “wattle”) las proteínas Jacob son cruzadas por las fibrillas de quitina depositadas en la superficie de la amiba. En la tercera fase (fase de embadurnamiento o “daub”) el quiste se solidifica y se hace impermeable a pequeñas moléculas gracias a la adición de la lectina Jessie3, la cual tiene un dominio N-terminal que se une a la quitina y un dominio único C-terminal que aparentemente causa auto-agregación. (Imagen de Anirban *et al.*, 2009).

### 3.6. Enquistamiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*

El conocer la biología y el mecanismo de patogénesis de *E. histolytica* ha estado limitado por la falta de procedimientos eficientes para inducir *in vitro* su proceso de enquistamiento. Se han presentado avances de la biología de este protozooario a partir de la aparición de los primeros medios sintéticos para su cultivo y su posterior perfeccionamiento.

Los estudios sobre el quiste de *E. histolytica* se han centrado en su obtención *in vitro*; sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito un procedimiento completamente reproducible que resulte en las formas maduras infestivas. Las condiciones presentadas dentro del intestino humano que inducen el enquistamiento de esta amiba son hasta el momento desconocidas casi en su totalidad.

Para lidiar con la dificultad de obtener quistes de *E. histolytica*, se ha estudiado el proceso de enquistamiento utilizando como modelo a *E. invadens*, aunque los datos obtenidos de dichos experimentos no sean totalmente extrapolables al proceso equivalente en *E. histolytica* (López-Romero, 1993), además de que en estudios basados en secuencias de genes del RNA de miembros de la familia Amoebidae, se ha observado que *E. invadens* y *E. histolytica* difieren filogenéticamente (Silverman *et al.*, 1999).

En las últimas décadas se han logrado avances muy importantes en cuanto al estudio sobre el proceso de enquistamiento y se han ido desarrollando y perfeccionando diferentes medios que promueven este proceso en *E. invadens* (Rengpein y Bailey, 1975; Das *et al.*, 1980; Avron *et al.*, 1986; Saíd *et al.*, 1988; Nayeem *et al.*, 1993). En 1997 se desarrolló un procedimiento para la inducción del enquistamiento axénico de *E. invadens* basado en alta tensión de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo, en el cual se obtienen estructuras semejantes a quistes (Morales-Vallarta y Villareal-Treviño, 1997).

En cuanto al enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica*, en 1986 Rivera y Correa logran enquistar a *E. histolytica* utilizando el medio TYI-S-33 adicionado con

tioglicolato; en ese mismo año Mata y Saíd reportan la inducción de estructuras con pared celular en el medio PEHPS.

Said-Fernández *et al.* reportaron en 1990, que cuando *E. histolytica* es mantenida en el medio PEHPS, adquiere espontáneamente semejanzas morfológicas con los quistes hasta en un 96%, aunque después de ser sometidos a un choque hipotónico, solo el 6% de estas células eran viable, ya que presentaban una pared quística anormal.

Diez años más tarde, González-Salazar *et al.* utilizaron también el medio PEHPS pero le añadieron diferentes factores estimulantes para obtener un porcentaje de obtención de EQ de entre 55-60%.

En 2001, Said-Fernández *et al.* logran favorecer la síntesis de la pared celular utilizando también el medio PEHPS enriquecido con los iones  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  y  $Co^{+2}$ , los cuales se creen sirven como cofactores para la enzima quitinsintetasa.

En 2008, Barrón-González *et al.* desarrollaron una metodología que induce axénicamente la formación *in vitro* de estructuras semejantes a quistes (ESQ) de *E. histolytica*, mediante la modificación del método con alta tensión de  $CO_2$  para inducir enquistamiento en *E. invadens* (Morales-Vallarta y Villareal-Treviño, 1997) combinado con ayuno de glucosa, histamina como agente reductor y bacterias enteropatógenas. En este experimento se logró obtener un porcentaje de obtención de EQ de *E. histolytica* de hasta un 92% con morfología muy similar a las obtenidas en pacientes diagnosticados con disentería amibiana.

Recientemente, en el 2010 se desarrolló un método para la producción de ESQ utilizando  $H_2O_2$  para su inducción. En este experimento se obtuvieron porcentajes más altos de ESQ tetranucleadas que en anteriores reportes, alrededor del 5%, y la morfología de las estructuras obtenidas coincidían también con la de los pacientes (Aguilar-Díaz *et al.*, 2010).

## 4. OBJETIVOS

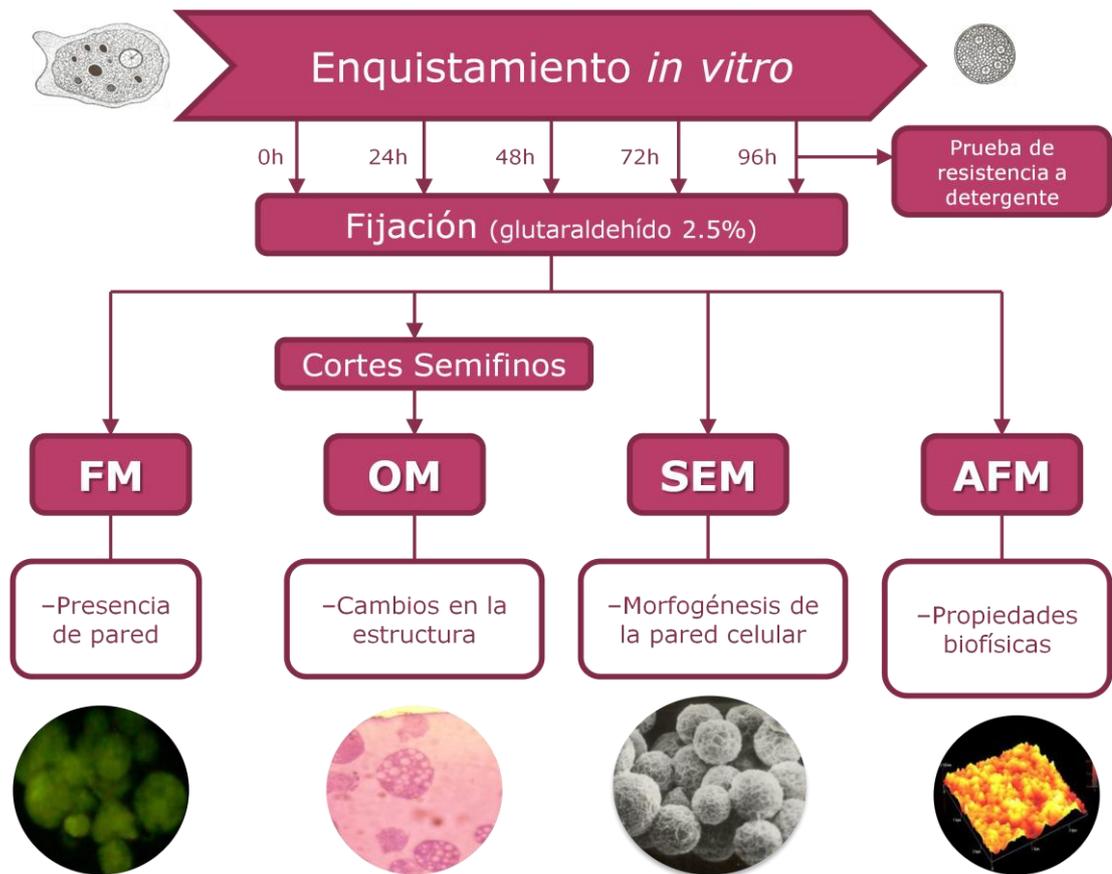
### 4.1. Objetivo general

Describir la morfogénesis de la pared del quiste y algunas propiedades biofísicas de *E. histolytica*.

### 4.2. Objetivos particulares

- Obtener la cinética de crecimiento de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas.
- Producción de estructuras quísticas (EQ) de *E. histolytica* mediante el método de alta tensión de CO<sub>2</sub>.
- Describir los cambios de relieve en la pared celular de EQ de *E. histolytica* durante el proceso de diferenciación mediante imágenes a través de SEM.
- Describir los cambios en la estructura *E. histolytica* durante su diferenciación a través de cortes semifinos de EQ obtenidas a diferentes tiempos y observadas en OM.
- Describir cambios particulares en relieve, tamaño, homogeneidad, rugosidad, adhesividad, topología y elasticidad de la pared celular de *E. histolytica* durante su diferenciación empleando AFM.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL



## 6. MATERIAL Y MÉTODO

### 6.1. Origen de los reactivos

Se utilizaron reactivos de grado reactivo provenientes de diferentes casas comerciales especificadas en la Tabla 1

**Tabla 1**  
Origen de los reactivos utilizados

<b>Reactivo</b>	<b>Casa comercial</b>
Peptona de caseína Extracto de levadura D-glucosa anhidra	Bioxon México
Extracto de bilis bovina Suero bovino estéril Ácido ascórbico L-cisteína Fosfato de potasio dibásico	Sigma Chemical Company USA
Acetona Etanol Dodecil sulfato de sodio Glutaraldehído	Control Técnico y Representaciones México
Vectashield -DAPI	Vector laboratories USA
Resina epóxica	Electron microscopy science laboratories USA
Calcofluor M2R Fosfato de potasio monobásico Hidróxido de sodio Acido clorhídrico Cloruro de sodio	Productos Químicos Monterrey México

## 6.2 Material biológico

- a) Cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica*
- b) Suero bovino estéril
- c) Extracto hígado-páncreas
- d) Extracto de bilis-bovina

## 6.3 Medio de cultivo PEHPS

Para el cultivo de *E. histolytica* se empleó el medio PEHPS, el cual se preparó empleando los componentes descritos en la Tabla 2.

**Tabla 2**  
Composición del medio de cultivo PEHPS

Componentes	Concentración (g/1000 mL de H <sub>2</sub> O bidestilada desionizada)
Peptona de caseína	10.0 g
Extracto de hígado-páncreas	250 mL
L-cisteína	1.0 g
Acido ascórbico	0.20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6 g
D-glucosa anhidra	6.0 g

Se mezclaron todos los componentes descritos en la tabla 2 y se disolvieron en 1 L de agua bidestilada desionizada, enseguida se ajustó a pH 7.0 empleando NaOH 10 N, después se procedió a distribuir el medio en alícuotas de 10 mL en tubos de borosilicato de 13x100 mm con tapón de rosca y se esterilizaron a 121°C/20 min y 21 Lb de presión en autoclave. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y enseguida se almacenaron en congelación hasta su empleo.

#### 6.4 Preparación de soluciones

- a) Acetona al 30%. Se tomaron 30 mL de acetona y se aforó a 100 mL con agua destilada.
- b) Acetona al 50%. Se tomaron 50 mL de acetona y se aforó a 100 mL con agua destilada.
- c) Acetona al 70%. Se tomaron 70 mL de acetona y se aforó a 100 mL con agua destilada.
- d) Acetona al 90%. Se tomaron 90 mL de acetona y se aforó a 100 mL con agua destilada.
- e) Acido clorhídrico 0.1 N. Se aforó hasta 50 mL con agua destilada 0.41 mL de HCl concentrado.
- f) Azul de toluidina. Se disolvieron 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.
- g) Buffer de cacodilato de sodio. Se disolvieron 85.6 g de sales de sodio de ácido cacodílico en 1 L de agua destilada.
- h) Buffer de fosfatos 0.2 M. Se formaron dos soluciones de trabajo. Para la solución A se disolvieron 27.8 g de  $K_2HPO_4$  en 1000 mL de agua destilada. Para la solución B se disolvieron 53.65 g de  $KH_2PO_4$  en 1000 mL de agua destilada. Después se mezclaron 28 mL de la solución A con 72 mL de la solución B, obteniendo un volumen final de 100 mL a pH 7.2.
- i) Buffer salino de fosfatos (PBS) Se mezclaron 8 g de NaCl, 1.44 de  $K_2HPO_4$ , 0.24 de  $KH_2PO_4$  y 0.2 g de KCl; se disolvieron en 1L de agua destilada, se le ajustó el pH a 7.4 y se esterilizó en autoclave.
- j) Calcofluor M2R 1%. Se disolvió 0.1g del reactivo calcofluor M2R en 10 mL de agua desionizada pH 7.0, se almacenó en oscuridad a 4°C.

- k) Dodecil sulfato de sodio 0.15%. Se disolvió 0.15 g de dodecil sulfato de sodio en agua destilada y posteriormente se aforó hasta 100 mL.
- l) Glutaraldehído 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 con concentración de 2.5%.
- m) Hidróxido de sodio 10 N. Se disolvieron 40 g de NaOH en 100mL de agua destilada.
- n) Resina epóxica. Se mezclaron 8 g de DDSA (dodecanyl succinic anhydride), 7 g de NMA (nadic methyl anhydride), 20 gotas de DMP30 (2,4,6-{tri (dimethylaminoethyl) fenol} y 13 g de EMbed-812 (Epon -812 substitute).
- o) Tetraóxido de osmio 2%. Se disolvieron 0.25 g de OsO<sub>4</sub> en 25 mL de buffer de fosfatos 0.12 M quedando a concentración final de 2%.

### **6.5 Mantenimiento de *E. histolytica* HMI-IMSS**

Cuando las células se encontraban en la mitad de su fase logarítmica de crecimiento se hicieron resiembras sucesivas de  $5 \times 10^3$  trofozoítos /mL en medio PEHPS, agregando a cada tubo de 13x100 mm de tapón de 0.5 mL de suero bovino. La cepa fue incubada a 37°C por 72 h. Previo a cada resiembra los cultivos se observaron en un microscopio invertido para comprobar el buen estado de las células.

El cultivo celular contenido en los tubos de 13x100 mm fue colocado en agua-hielo a temperatura de congelación por 20 min, con la finalidad de despegar las células adheridas al tubo.

El número de células/mL fue determinado tomando un alícuota del cultivo y determinando el número de trofozoítos presentes con la ayuda de una cámara de Neubauer.

## **6.6 Cinética de crecimiento de *E. histolytica***

Se enfrió el tubo fuente de inóculo en agua-hielo durante 20 min, se inocularon  $5 \times 10^3$  trofozoítos/mL de *E. histolytica* en 28 tubos de 13x100 mL los cuales contenían 5 mL del medio PEHPS y 0.5 mL de suero bovino; se incubaron a 37°C durante 7 días y cada 24 h se determinó el número de trofozoítos/mL empleando una cámara de Neubauer. Después se realizó una grafica con los datos obtenidos para obtener la cinética de crecimiento de *E. histolytica*.

## **6.7 Obtención de estructuras quísticas ( EQ) de *E. histolytica***

Para inducir el enquistamiento de *E. histolytica* se empleó el método de alta tensión de CO<sub>2</sub>, el cual consta de dos fases.

En la primera fase (fase de crecimiento) se incubaron  $5 \times 10^3$  trofozoitos en tubos de 18x150 mm conteniendo 10 mL de medio PEHPS y 1 mL de suero bovino, se gasearon los tubos con CO<sub>2</sub> con un flujo de 0.4 L/min por 2 min, introduciendo hasta el fondo del tubo una pipeta Pasteur con filtro de algodón, la cual se encontraba conectada a un tanque conteniendo CO<sub>2</sub> de 99.9% de pureza, posteriormente se incubaron a 37°C por 72 h. Transcurrido este periodo se enfriaron los tubos en el congelador en agua-hielo por 20 min, enseguida se vertió el contenido de tres tubos en un tubo cónico de 50 mL, enseguida el contenido de los tubos con las células se centrifugó a 5,000 rpm/5 min y se eliminó el sobrenadante, reservando el paquete celular.

En la segunda fase (fase de enquistamiento) se utiliza el paquete celular proveniente de la fase anterior, se inocularon  $6 \times 10^6$  cel/mL en cada uno de los tubos de 18x150 mm que contenían 10 mL del medio PEHPS sin glucosa y 1 mL de suero bovino, de nuevo se gasearon los tubos con CO<sub>2</sub> con un flujo de 0.4 L/min por 2 min con ayuda de una pipeta Pasteur, y posteriormente se incubaron a 37°C por 96 h.

## **6.8 Prueba de viabilidad de EQ**

Para determina el porcentaje de rendimiento de las formas quísticas de *E. histolytica* se tomaron los tubos de la última fase (96 h) de la etapa de enquistamiento, se centrifugaron a 10,000rpm/10 min y el paquete celular obtenido

fue aforado a 10 mL, posterior a esto se realizaron conteos celulares en cámaras de Neubauer previos y posteriores a la aplicación del detergente SDS 0.1% por 10 min.

## **6.9 Fijación de las muestras**

Durante la fase de enquistamiento, se tomaron 10 tubos cada 24 h, estos fueron centrifugados a 10,000 rpm/5 min, se desechó el sobrenadante y el paquete celular fue depositado en tubos eppendorf para ser centrifugados en una centrífuga eppendorf, el paquete celular obtenido fue fijado con glutaraldehído al 2.5% para ser observado en las diferentes microscopías.

## **6.10 Microscopía de fluorescencia (MF)**

Las EQ resistentes al SDS al 0.1% se fijaron con glutaraldehído al 2.5% y se observaron en el microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX70, para lo cual una gota de la muestra fue colocada sobre un portaobjetos y sobre esta se agregó una gota del marcador calcofluor M2R al 1% y se observó inmediatamente.

## **6.11 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Las EQ fijadas en glutaraldehído 2.5% se centrifugaron a 1000 rpm/5 min para después lavar la muestra 3 veces con PBS. Posteriormente se procedió a deshidratar la muestra con etanol al 60%, 70%, 80%, 90% y 100%, 10 min en cada uno de ellos. Las muestras fueron colocadas en portaobjetos para ser observadas en el microscopio electrónico de barrido Nova NanoSEM 200.

## **6.12 Obtención de cortes semifinos para su observación en microscopía óptica (OM)**

Las muestras fueron lavadas en buffer de cacodilatos 3 veces durante 5 min, para después ser post-fijadas en tetraóxido de osmio al 2% durante 30 min. Posteriormente se realizaron de nuevo 3 lavados de 5 min en buffer de cacodilatos y se les añadió a las muestras nitrato de uranilo acuoso 1% por 30 min. De nuevo las muestras fueron lavadas en buffer de cacodilatos 3 veces por 5 min. Después las muestras fueron sometidas a acetonas al 30%, 50%, 70%, 90% y 100% cada una por

5 min para finalmente dejarlas toda la noche en una mezcla 1:1 de acetona: resina (preinclusión) a 4°C. Posteriormente se dejaron evaporar las muestras bajo campana de extracción por 4 h para después realizar la inclusión en resina pura 1 h a temperatura ambiente. Después para la polimerización de la resina se dejaron las muestras de 12-72 h a 60°C para la obtención de los bloques. Para la obtención de las muestras semifinas, estas fueron cortadas utilizando el ultramicrotomo RMC MT-7000 Ultra y teñidas con azul de toluidina.

### **6.13 Microscopía de fuerza atómica (MFA)**

Para observar las muestras en MFA se lavaron las células fijadas en glutaraldehído 2.5% en agua bidestilada desionizada. Posteriormente una gota de la muestra se colocó en el portamuestras del microscopio, éste se introdujo en la celda y se observaron en el MFA Scanning Probe Microscope. Los análisis fueron realizados con ayuda de los softwares Nanoscope IIIa de Digital Instruments Veeco Metrology Group y WSxM Program de Nanotec.

#### **6.13.1 Modo de contacto**

Cuando el MFA se encuentra en modo de contacto, la punta está físicamente en contacto con la superficie de muestra al realizar el barrido. Utilizando este modo es posible obtener imágenes de altura y de amplitud (o deflexión) del cantiléver.

Las imágenes de altura son un mapa de de pixeles de diferentes colores, donde cada color se relaciona con una altura diferente. La apariencia de la imagen muchas veces es muy diferente a la que se tendría en un OM o un SEM, razón por la cual es común transformar estas imágenes de altura a una imagen de 3-D.

Las imágenes de amplitud son el equivalente a un mapa del declive de la muestra.

#### **6.13.2 Modo de no contacto (tapping)**

Al utilizar el modo no contacto (o tapping) la punta del cantiléver oscila cerca de la superficie (con amplitudes de oscilación menores a 10 nm) y con una frecuencia de resonancia de algunos Hertz, es decir, se mantiene la amplitud de oscilación constante y, a partir de esto, se obtiene la imagen. Mediante esta técnica es posible la obtención de imágenes de cambio de fase (además de imágenes de altura y de amplitud), la cual está relacionada con los cambios en la

fase de oscilación del cantiléver debido a la interacción de la punta con la muestra, haciendo posible diferenciar entre la homogeneidad de la dureza de la muestra.

### **6.13.3 Obtención de curvas fuerza-distancia**

Para obtener las curvas fuerza-distancia se lleva a cabo una nanoindentación al penetrar la punta del cantiléver en la muestra, de esta manera la profundidad a la cual la punta se introduce depende de varios factores, como son: fuerza de desprendimiento, fuerza aplicada sobre la punta, interacciones entre la muestra y la punta y dureza relativa.

### **6.13.4 Modulo elástico**

Para la obtención del modulo elástico de la muestra, se utilizan las curvas de fuerza-distancia obtenidas en experimentos de nanoindentación, las cuales son ajustadas utilizando el modelo de Hertz, el cual es el modelo más apropiado y más utilizado en sistemas celulares.

### **6.13.5 Trabajo de adhesión**

El trabajo de adhesión es la fuerza necesaria ejercida por la punta de nitruro de silicio para poder desprenderse de la superficie celular (fuerza de desprendimiento). Este parámetro también se obtiene a partir de las curvas de fuerza-distancia obtenidas por nanoindentación.

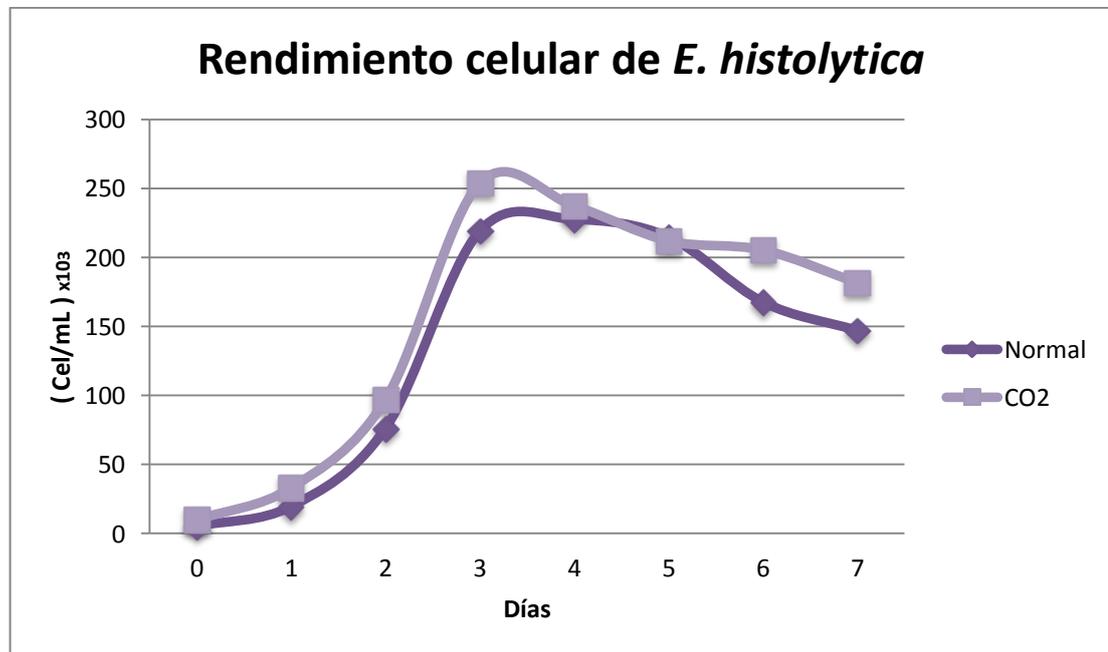
### **6.13.6 Rugosidad**

Para la obtención de la rugosidad de la muestra se analizan las imágenes de altura obtenidas en modo tapping. Los datos se obtienen utilizando el software Nanoscope sobre un área determinada de la imagen, obteniendo así la rugosidad ( $R_q$ ).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica* bajo condiciones normales y con alta tensión de CO<sub>2</sub>

Se realizó la cinética de crecimiento de *E. histolytica* en el medio PEHPS bajo condiciones normales y con alta tensión de CO<sub>2</sub>. Se encontró que en ambos casos las células muestran rendimientos muy parecidos y ambas curvas en la gráfica se comportan de la misma manera. Se observa una ligera fase de adaptación celular durante las primeras 24 h para, a partir de ese tiempo, observarse una fase de crecimiento logarítmico. Se encontró un rendimiento ligeramente menor en las células incubadas con alta tensión de CO<sub>2</sub>, y en ambos casos el rendimiento celular máximo se presentó a los 3 días de incubación (72 h) y posteriormente se observa un notable descenso en el número de células presente en ambos cultivos (Fig. 4).



**Fig.4. Curva de crecimiento de *E. histolytica*.** Cinética de crecimiento de *E. histolytica* en el medio PEHPS bajo condiciones normales y con alta tensión de CO<sub>2</sub>.

## 7.2 Producción de EQ de *E. histolytica* mediante el método de alta tensión de CO<sub>2</sub>

La obtención de las estructuras quísticas se llevó a cabo utilizando el método de alta tensión de CO<sub>2</sub>. Cada 24 h, comenzando por las 72 h, se tomó una muestra del cultivo en proceso de diferenciación celular y se fijó utilizando glutaraldehído al 2.5%.

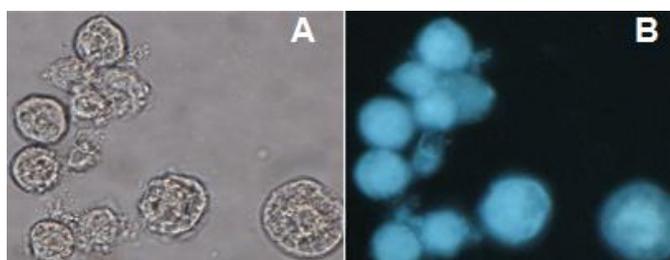
A las estructuras quísticas obtenidas a las 96 h del tratamiento se les realizó una prueba de resistencia al detergente Sarcosyl 1%. Se obtuvo un porcentaje de EQ resistentes al detergente del 83%.

## 7.3 Microscopia de fluorescencia (FM)

Las estructuras obtenidas fueron observadas al microscopio de fluorescencia utilizando como marcador calcofluor M2R. Las células fueron observadas en un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX70.

### 7.3.1 Patrón de fluorescencia de estructuras quísticas (EQ)

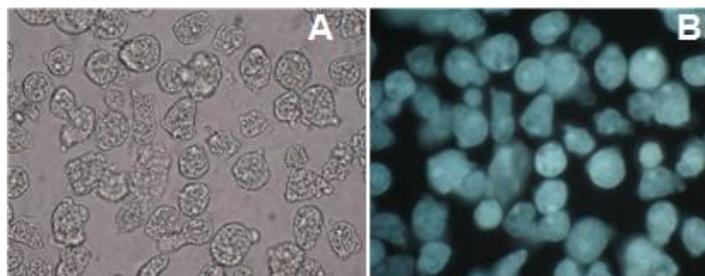
En la figura 5 imagen B se observa el aspecto que presentaron las EQ de *E. histolytica* obtenidas a las 96 h de enquistamiento que fueron resistentes al detergente SDS 0.1%, en presencia de calcofluor M2R al microscopio de fluorescencia. Se observa que las EQ emiten una fluorescencia intensa. La imagen A corresponde al mismo grupo de células vistas a microscopia de luz. Donde se observa que todas las estructuras redondeadas presentes en la imagen A fluorescen en la imagen B.



**Fig.5. Patrón de fluorescencia de EQ.** Imagen A: grupo de EQ observadas en campo claro; imagen B: el mismo grupo de EQ en presencia de calcofluor M2R vistas en FM. Aumento original 150X.

### 7.3.2 Patrón de fluorescencia de trofozoítos

La figura 6 muestra un cultivo de trofozoítos de *E. histolytica* a las 72 h de crecimiento. Como se puede observar en la figura 6B, los trofozoítos marcados con calcofluor M2R presentan fluorescencia (menos intensa que la observada en las EQ) al ser observados con luz UV. La figura 6A corresponde a la misma imagen observada en campo claro.



**Fig.6. Patrón de fluorescencia de trofozoítos.** Imagen A: grupo de trofozoítos observados en campo claro; imagen B: el mismo grupo de trofozoítos en presencia de calcofluor M2R vistas en FM. Aumento original 100X.

### 7.3.3 Observación de núcleos de EQ y trofozoítos con el marcador DAPI

Trofozoítos y EQ fueron observados en MF y luz ultravioleta con el marcador DAPI (dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindol), el cual tiene afinidad por el DNA que se encuentra en el/los núcleos presentes en la célula. La imagen 7A corresponde a un cultivo de trofozoítos, en donde se observa la presencia de un solo núcleo en cada una de las células, caso contrario en la muestra con EQ (Fig. 7B) en la cual se pueden observar más de un núcleo por célula.



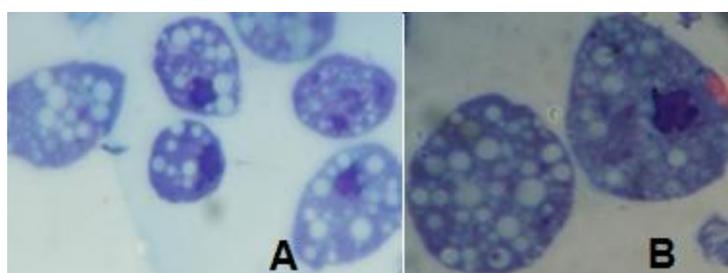
**Fig.7. Núcleos de trofozoítos y EQ observados con DAPI.** Imágenes de trofozoítos (imagen A) y EQ4 (imagen B) de *E. histolytica* marcados con DAPI y observados en microscopía de fluorescencia. Aumento original 400X.

## 7.4 Cortes semifinos en microscopía óptica (OM)

Los cortes semifinos de las diferentes etapas de *E. histolytica* en su diferenciación celular fueron observados con OM.

### 7.4.1 Observación de cortes semifinos de trofozoítos

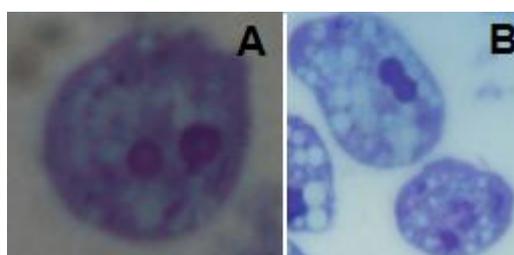
En la figura 8 (imágenes A y B) se pueden observar algunas características de la estructura de *E. histolytica* en su estadio de trofozoíto. Se observa la forma irregular de la célula, presencia de pseudópodos, la abundancia de vacuolas y la presencia de un núcleo, el cual no siempre tiene forma esférica.



**Fig.8. Cortes semifinos de trofozoítos de *E. histolytica*.** Ambas imágenes muestran cortes semifinos de trofozoítos de *E. histolytica* teñidos con azul de toluidina. Aumento original 150X.

### 7.4.2 Observación de cortes semifinos de prequistes

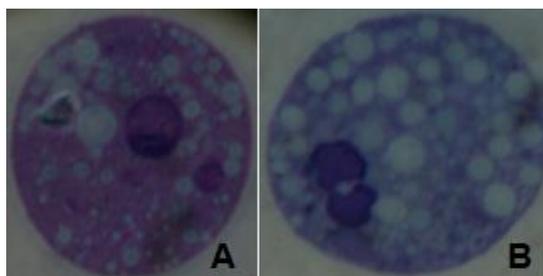
Fueron observados también cortes semifinos de células en estadio de prequiste (EQ1, EQ2 y EQ3), estas células presentaron morfología semiredondeada, más de un núcleo, y menor tamaño que los trofozoítos (Fig.9A y B).



**Fig.9. Cortes semifinos de prequistes de *E. histolytica*.** Imágenes de cortes semifinos de prequistes de *E. histolytica* teñidos con azul de toluidina. Aumento original 400X.

### 7.4.3 Observación de cortes semifinos de EQ

La figura 10 (imágenes A y B) corresponden a los cortes semifinos de las EQ4. Las células tienen forma redonda, hay vacuolas presentes y más de un núcleo, (se llegaron a observar en el mismo corte hasta 3 núcleos en una célula). Se evidencia también que los núcleos no son todos circulares.



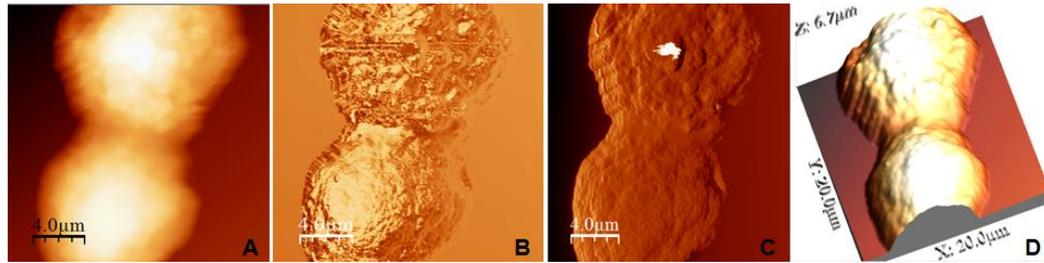
**Fig.10. Cortes semifinos de EQ de *E. histolytica*.** Las imágenes A y B muestran cortes semifinos de EQ de *E. histolytica* teñidos con azul de toluidina. Aumento original 400X.

## 7.5 Microscopía de fuerza atómica (MFA)

Las estructuras quísticas obtenidas y fijadas en glutaraldehído 2.5% fueron observadas en un microscopio de fuerza atómica Multimode con controlador Nanoscope IIIa (Digital Instrument, Santa Barbara). Se utilizaron cantilevers con una constante de resorte de 0.03 N/m. Las imágenes fueron analizadas con ayuda de los softwares Nanoscope IIIa de Digital Instruments Veeco Metrology Group y WSxM Program de Nanotec.

### 7.5.1 Análisis de imágenes de AFM

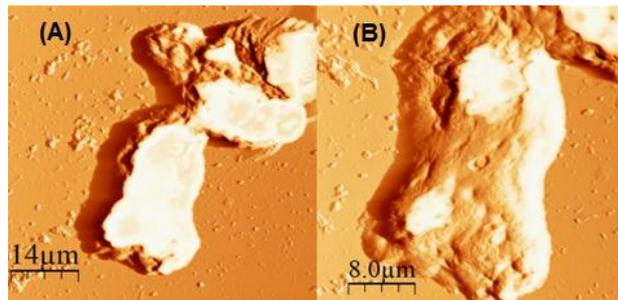
Las células obtenidas a diferentes tiempos fueron observadas al MFA. Se obtuvieron imágenes de altura (A), amplitud (B), fase (C) y altura en 3D (D) de cada una de las microscopías obtenidas por AFM. Éstas fueron analizadas en el software para la obtención de las características que se describen más adelante.



**Fig.11. Imágenes obtenidas en AFM.** Imágenes que corresponden a: altura (A), amplitud (B), fase (C) y altura en 3D (D) de la misma microscopías.

### 7.5.2 Imágenes de trofozoítos

En la figura 12 se puede observar un trofozoíto obtenido a las 0 h de tratamiento de enquistamiento. La imagen A corresponde a un aglomerado de trofozoitos presentes en el cultivo, mientras que la imagen B es un acercamiento al trofozoíto de la parte inferior de la imagen A. Ambas corresponden a imágenes de amplitud.

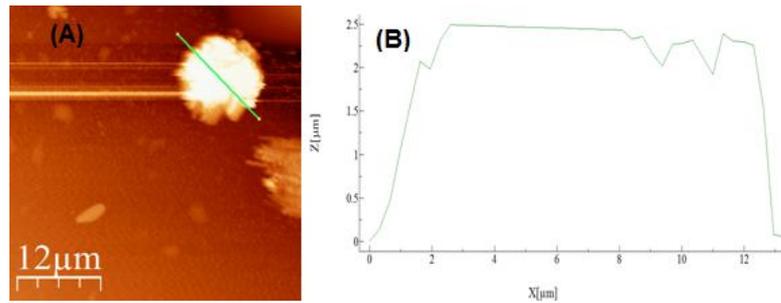


**Fig.12. Imágenes de amplitud de trofozoítos.** La imagen 12B corresponde a un acercamiento del grupo de trofozoítos de *E. histolytica* observado en la imagen 12A. Área:  $90 \times 90 \mu\text{m}^2$  (Fig. 12A) y  $40 \times 40 \mu\text{m}^2$  (Fig. 12B).

### 7.5.3 Dimensiones de EQ y trofozoítos

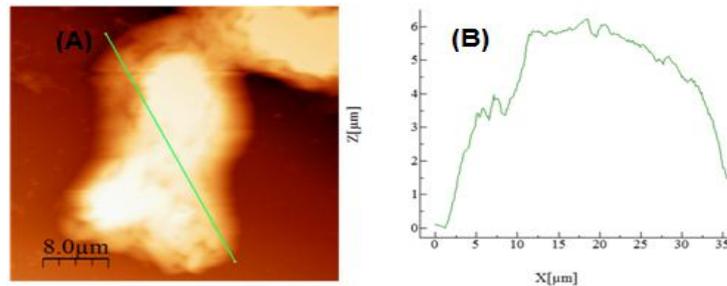
Se llevó a cabo la medición de dichas estructuras utilizando MFA (imagen de altura).

La figura 13, la imagen A corresponde a una imagen de una EQ enquistada por 96 h (EQ4), donde resalta la imagen de una EQ redondeada, se analizó un corte transversal (línea verde) de la misma EQ para obtener datos sobre sus medidas. En la imagen B se observa una gráfica de los ejes X y Z de la misma estructura. En estas medidas se aprecia que esta estructura alcanza una altura de hasta  $2.5 \mu$  y mide alrededor de  $12 \mu$  de diámetro.



**Fig.13. Medición de una EQ4.** La imagen 13B corresponde a la medición de la imagen de altura de una EQ4 (Fig. 13B) en un corte transversal (línea verde). Área:  $60 \times 60 \mu\text{m}^2$ .

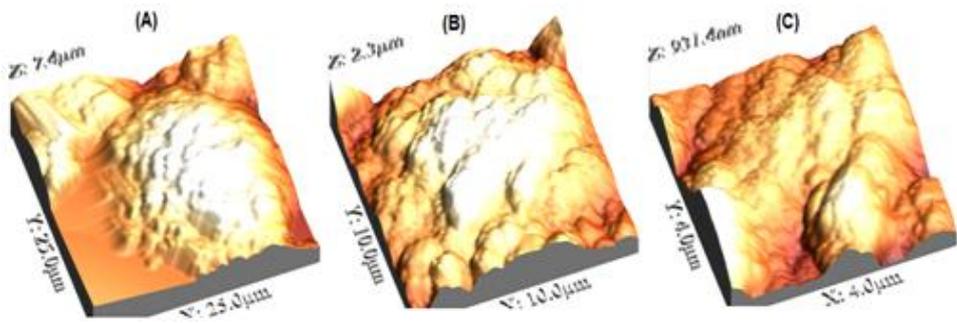
Por otro lado, se llevó a cabo de la misma manera la medición de las dimensiones de los trofozoítos presentes en los cultivos en el día 0. En la figura 14 se observa un trofozoíto en MFA, se observa que posee una morfología típica. La imagen B de la misma figura corresponde a un corte transversal (línea verde) del trofozoíto de la imagen A, donde se pueden apreciar que la célula posee un diámetro de alrededor de  $35 \mu$  y una altura de hasta  $6 \mu$ .



**Fig.14. Medición de un trofozoíto.** La imagen 14B corresponde a la medición de la imagen de altura de trofozoíto de *E. histolytica* (Fig. 17A) en un corte transversal (línea verde). Área:  $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ .

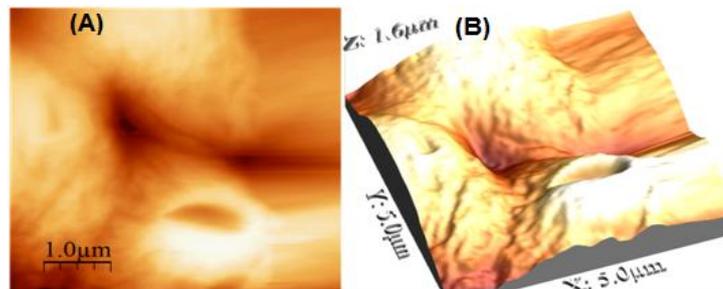
#### 7.5.4 Relieve de EQ y trofozoítos

También se analizaron imágenes del relieve de las células obtenidas a diferentes tiempos, imágenes de altura en 3D, en estas imágenes se puede observar con mucho más detalle que en el SEM el relieve y la topología de la pared celular, así como las diferencias que presentan las células durante la morfogénesis de su pared. En la figura 15 se puede apreciar con detalle las variantes en la superficie externa de la estructura quística obtenida a las 96 h de enquistamiento (EQ4), se puede apreciar que la EQ posee una superficie rugosa.



**Fig.15. Relieve de la superficie celular de una EQ4.** Topología de la misma EQ a escalas de  $25 \times 25 \mu\text{m}^2$  (Fig. 15A),  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  (Fig. 15B) y  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$  (Fig. 15C).

De la misma manera, se tomaron imágenes para describir el relieve de los trofozoítos obtenidos a las 0 h de enquistamiento. La figura 16 corresponde a la misma zona de uno de los trofozoitos observados. La imagen A es la imagen de altura observada en el MFA, mientras que la imagen B corresponde al gráfico en 3D de la misma imagen obtenida por el software WSxM. En la imagen se puede observar un relieve irregular en la membrana del trofozoíto de *E. histolytica*, al igual que la presencia de estructuras parecidas a poros en superficie de la membrana.

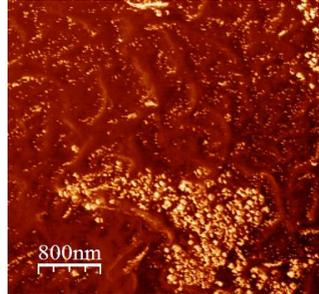


**Fig.16. Relieve de la membrana de un trofozoíto.** Imagen del relieve de la membrana de un trofozoíto de *E. histolytica*. Imagen A: altura, Imagen B: altura en 3D. Área:  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ .

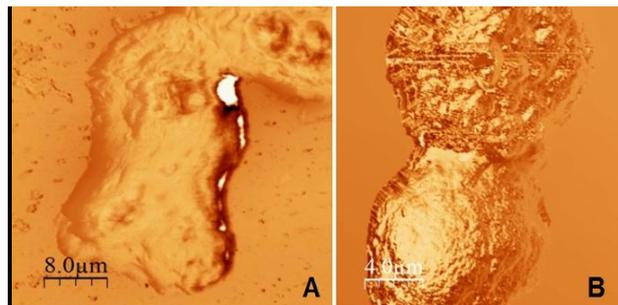
### 7.5.5 Homogeneidad en la superficie celular

En las imágenes de fase obtenidas por AFM se puede observar la homogeneidad de la superficie las muestras basadas en la dureza de las mismas. En la figura 17 se observan claramente dos fases diferentes (diferencia de colores) en la superficie celular de una EQ3. Lo cual contrasta claramente con lo observado en la figura 18, donde se observa la uniformidad en el color, en este caso amarillo,

evidenciando así la uniformidad en la superficie celular, tanto de la membrana celular en el caso del trofozoíto (fig.18A), como de la pared quística en el caso de la EQ4 (fig. 18B).



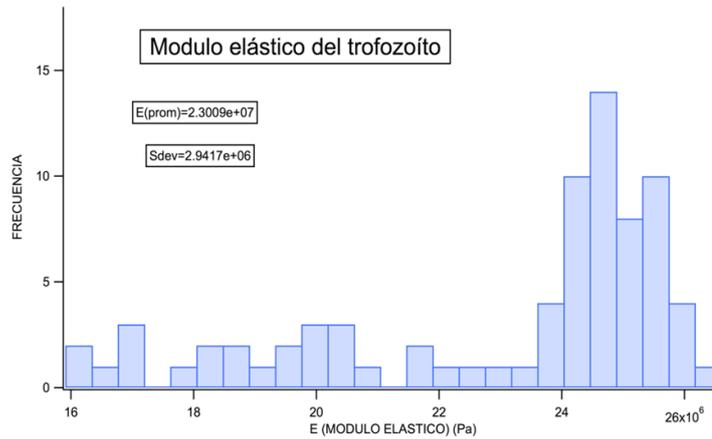
**Fig.17. Diferencia en la homogeneidad de la superficie de una EQ3.** Superficie celular de una EQ3, visualizada en la diferencia de colores en la imagen. Área:  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ .



**Fig.18. Homogeneidad de la superficie celular de trofozoítos y EQ4.** Imagen donde se puede apreciar la homogeneidad de la superficie celular (visualizada en la uniformidad del color) de un trofozoíto (Fig.18A) y de una EQ4 (Fig. 18B). Área:  $40 \times 40 \mu\text{m}^2$  (Fig. 18A) y  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$  (Fig. 18B).

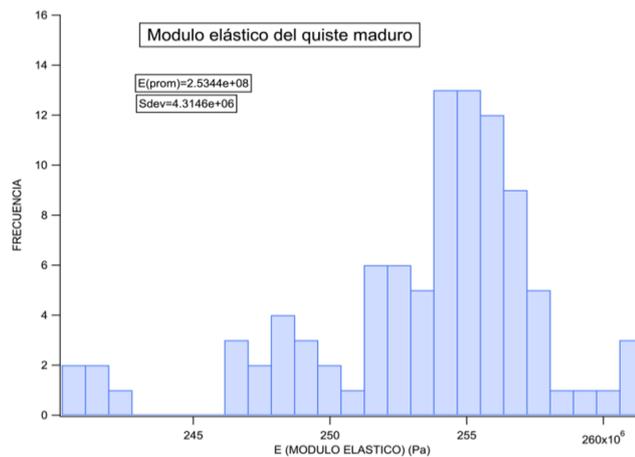
#### 7.5.6 Módulo elástico de EQ y trofozoítos

En la figura 19 se muestra el histograma de los valores de elasticidad obtenidos para las curvas de las muestras de los trofozoítos, el promedio de estas medidas es de  $\approx 2.3 \times 10^7$  Pa.



**Fig.19. Módulo elástico del trofozoíto.** Histograma de elasticidad obtenido después del ajuste de las curvas del trofozoíto de *E. histolytica*.

La figura 20 muestra el histograma de los valores de elasticidad obtenidos para las curvas de las muestras de las EQ4, el promedio de estas medidas es de  $\approx 2.5 \times 10^8$  Pa.

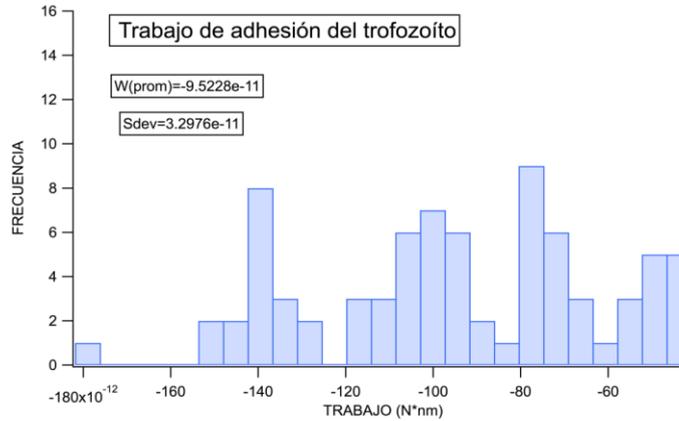


**Fig.20. Módulo elástico de una EQ4.** Histograma de elasticidad obtenido después del ajuste de las curvas de la EQ4 de *E. histolytica*.

El valor comparado de el trofozoíto es prácticamente una unidad de magnitud más grande que el de la EQ4, esto nos indica que la membrana celular es más elástica que la pared quística, o dicho de otra manera, la pared de la EQ4 es un orden de magnitud mas rígida que la membrana celular del trofozoíto.

### 7.5.7 Trabajo de adhesión

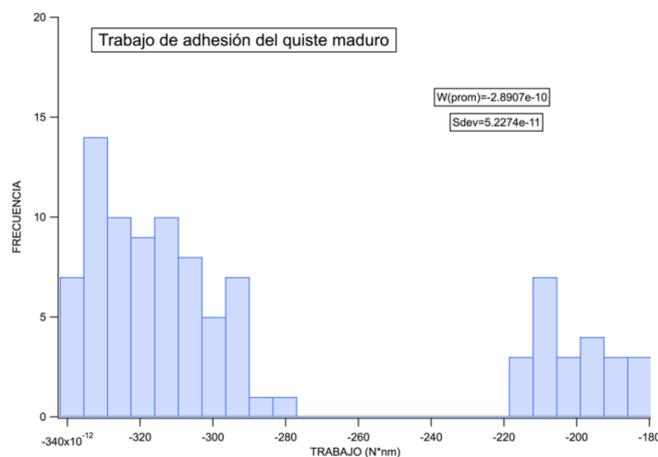
La figura 21 muestra el histograma del trabajo de adhesión entre la punta y la membrana del trofozoíto, el promedio de estas medidas es de  $\approx -9.5 \times 10^{-11}$  N\*nm.



**Fig.21. Trabajo de adhesión del trofozoíto.** Histograma del trabajo de adhesión en la membrana del trofozoíto de *E. histolytica*.

Mientras que en la figura 22 se muestra el histograma del trabajo de adhesión entre la punta y la pared quística de la EQ4, el promedio de estas medidas es de  $\approx -2.9 \times 10^{-10}$  N\*nm.

Los resultados obtenidos muestran un trabajo de adhesión una orden de magnitud mayor en las EQ4 que en los trofozoítos, esto nos indica que existe una mayor interacción de la punta con la pared quística de la EQ4 que con la membrana celular de los trofozoítos.



**Fig.22. Trabajo de adhesión de una EQ4.** Histograma del trabajo de adhesión en la pared de la EQ4 de *E. histolytica*.

### 7.5.8 Rugosidad

Se realizaron también medidas de rugosidad para zonas de  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  tanto en el trofozoíto como en el EQ2 y EQ4 utilizando el modo de no-contacto (o tapping) y condiciones secas (Tabla 3).

**Tabla 3**  
**Rugosidad de los estadios de *E. histolytica* en modo tapping**

Muestra	Rugosidad
Trofozoíto	$20.9 \pm 16.7 \text{ nm}$
EQ2	$27.7 \pm 9.1 \text{ nm}$
EQ4	$80.1 \pm 15.6 \text{ nm}$

Como se puede apreciar en la tabla 3 la rugosidad va incrementando a medida que el trofozoíto va diferenciándose en una EQ4, evidenciando así que la superficie externa de la EQ4 es casi cuatro veces más rugosa que en los trofozoítos.

### 7.6 Microscopía de Barrido (SEM)

Las muestras obtenidas a diferentes tiempos fueron observadas también en el microscopio de barrido Nova NanoSem 200. Todas las imágenes fueron obtenidas con bajo vacío y utilizando el detector LVD (low vacuum detector) utilizando voltajes variados.

#### 7.6.1 Agrupación de EQ

Otras de las cosas que se pudo constatar con ayuda de las diferentes microscopías es la tendencia que muestran las EQ a agruparse a lo largo del proceso de enquistamiento. A medida que las células iban tomando la forma característica de quistes, éstas mostraron una tendencia a unirse entre ellas mismas, muy pocas de éstas permanecían separadas sin agruparse.

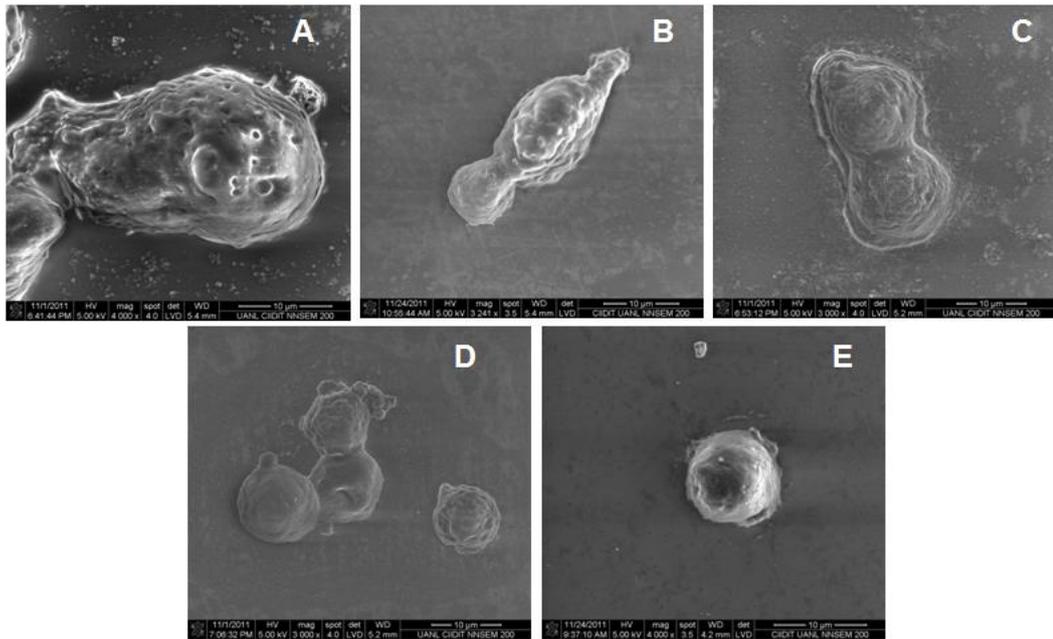
### **7.6.2 Morfología celular**

En la figura 23 se observa la morfología celular de los diferentes estadios de *E. histolytica* en aumentos de entre 3,000-4,000 veces. La imagen 23A corresponde a un trofozoíto, la 23B a una EQ1 (24 h de enquistamiento), la imagen 23C a una EQ2 (48 h de enquistamiento), la 23D a una EQ3 (72 h de enquistamiento) y la 23E a una EQ4 (96 h de enquistamiento).

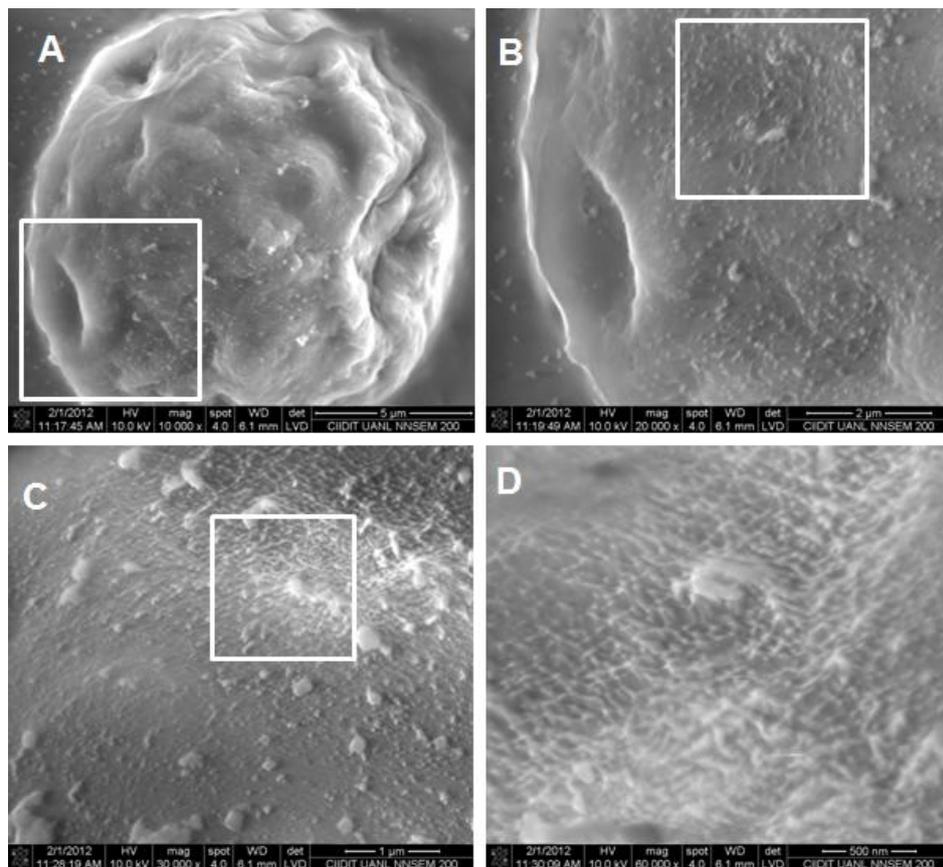
En las imágenes se observa claramente que conforme la célula va pasando por el proceso de inducción de enquistamiento con alta tensión de CO<sub>2</sub>, ésta deja de emitir pseudópodos, toma una forma redondeada y disminuye su tamaño, hasta tomar la morfología característica de un quiste maduro de *E. histolytica*.

### **7.6.3 Aparición de microfibrillas en la superficie celular**

Se observó en algunas imágenes de EQ2 (Fig.24) la aparición en ciertos puntos de la superficie celular de unas estructuras parecidas a microfibrillas, éstas formaban pequeñas redes que aparecían a lo largo de algunas zonas de la superficie celular de las EQ2.



**Fig.23. Morfología celular de *E. histolytica* en SEM.** Imágenes en SEM de trofozoíto (A), EQ1 (B), EQ2 (C), EQ3 (D) y EQ4 (E) de *E. histolytica*. Aumento: 3,000-4,000X



**Fig.24. Microfibrillas en la superficie celular de una EQ2 de *E. histolytica*.** Secuencia de imágenes de la misma EQ2 donde se pueden apreciar pequeñas redes de microfibrillas en la superficie celular (Imágenes C y D). Aumento: 10,000x (Fig. 24A), 20,000x (Fig. 24B), 30,000x (Fig. 24C) y 60,000x (Fig. 24D).

## 8. DISCUSION

En la actualidad existen muy pocas metodologías y/o medios que han permitido, bajo diferentes condiciones y con diferente rendimiento, la obtención de estructuras quísticas de *E. histolytica*, esto se debe principalmente al desconocimiento de las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el proceso de enquistamiento.

Basados en la semejanza morfológica que existe entre *E. invadens* y *E. histolytica*, en este trabajo se utilizó el “método de alta tensión de CO<sub>2</sub>”, por Morales-Vallarta y Villareal-Treviño en 1997, el cual fue utilizado para obtener formas quísticas de *E. invadens*.

El porcentaje de obtención de EQ en este experimento fue del 83%, porcentaje menor que el reportado por Barrón-González *et al* en 2007, esto pudo deberse a que, a diferencia del “método modificado de alta tensión de CO<sub>2</sub>”, este experimento fue realizado utilizando el medio de cultivo PEHPS y no TYI-S-33, además de que se utilizaron condiciones diferentes como la adición de bilis bovina en el medio, que, aunque no ha sido reportado anteriormente, se observó en experimentos de laboratorio previos que cuando ésta se añade al medio de cultivo PEHPS las EQ presentan una morfología mas semejante a los quistes de pacientes.

La resistencia de las EQ al detergente sarcosyl da evidencia de la formación de la pared quística, la cual es una estructura de resistencia que le brinda protección a la célula contra condiciones adversas. Esta estructura es formada como parte del proceso de enquistamiento y es inexistente en el estadio celular de trofozoíto.

Al FM las EQ obtenidas emitieron una fluorescencia intensa en luz UV en presencia del marcador calcofluor M2R, contrario a los trofozoitos marcados que aunque presentaron fluorescencia, ésta fue menos intensa.

La fluorescencia presente en las EQ4 se debe a la presencia de polímeros de N-acetilglucosamina, componente principal de la pared quística de *E. histolytica*, el cual al ser marcado con calcofluor M2R y observado bajo luz UV (400-315 nm) emite una fluorescencia de color azul-blanco como el que se puede observar en las imágenes de fluorescencia de las EQ4 (Fig. 5). Llama la atención que los núcleos de los trofozoitos también fluorescen en presencia de calcofluor.

A pesar de que los trofozoitos no poseen una pared compuesta de quitina, éstos emitieron fluorescencia, aunque de menos intensidad que la observada en las EQ4 (Fig. 6), esto podría deberse a que en los trofozoitos se encuentran presentes algunos precursores de quitina, como la misma N-acetilglucosamina (Avron *et al*, 2004) o algunas quitin-sintetasa (grupo de enzimas de la familia de  $\beta$ -glicosil-transferasas) como las codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2 descritos en trofozoitos de *E. histolytica* en 2004 por Campos- Góngora *et al*.

La marcación con DAPI se realizó para evidenciar los núcleos presentes en la célula ya que este marcador posee afinidad por las regiones ricas en timina-adenina del DNA. Se encontraron EQ multinucleadas, mientras que los trofozoitos en su mayoría poseían un solo núcleo, aquellos que presentaban dos núcleos podrían encontrarse en preparación para la división celular, ya que la mitosis ocurre en forma asincrónica con la citocinesis en este protozoario (Majumder y Lohia, 2008).

Al analizar los cortes semifinos de trofozoitos a OM se observan células pleomórficas, en las cuales pueden llegar a observarse algunas extensiones del ectoplasma celular formando los pseudópodos característicos de *E. histolytica*. Las vacuolas que se observan en estas células pueden ser vacuolas fagocíticas, pinocíticas, autofágicas, cuerpos residuales, o incluso lisosomas que son normalmente encontrados en los trofozoitos, al igual que algunas vesículas secretoras específicas de los quistes de *E. histolytica* que pueden contener quitinasas (Shen y Jacobs, 1999). Cabe mencionar que existen otras vesículas presentes en el citoplasma de *E. histolytica*, sin embargo su naturaleza y función aun se desconoce. (Martínez-Palomo, 1986).

A pesar que reportes previos como los de Romero en 1993 afirman que los núcleos de *E. histolytica* (en cualquiera de sus estadios) son estructuras esféricas, con

cariosoma central y con cromatina distribuida uniformemente en la periferia; en nuestros cortes se observan algunos núcleos con diferentes morfologías que no coinciden con la citada con la literatura, estos podrían estar preparándose o atravesando alguna fase de división nuclear como sucede en *E. invadens* (Morales-Vallarta *et al.*, 1997).

Los análisis en AFM de las imágenes de altura de los estadios de *E. histolytica* nos permitieron analizar sus dimensiones. Tanto las medidas obtenidas en MFA, como las obtenidas en microscopía de contraste de fases (éstas últimas no mostradas) concuerdan en que los trofozoítos miden alrededor de 35 $\mu$ m de diámetro, y que las EQ maduras tienen un diámetro de aproximadamente 12 $\mu$ m (Fig. 13 y 14); ambas medidas concuerdan con los reportes previos de la literatura (Romero, 1994).

La figura 16 muestra la imagen del relieve en 3D de un trofozoíto, en la cual se muestra una estructura parecida a un poro en la superficie de la membrana celular, lo cual pudiera significar un proceso de pinocitosis en la célula.

Las imágenes de fase evidencian una diferencia en la homogeneidad de la muestra, este cambio es muy evidente en la figura 17 donde se observa una parte de la superficie celular de una EQ3 de color diferente al resto, lo cual refleja que cada una de las dos zonas con diferente color posee diferente dureza y naturaleza química. Estos resultados podrían deberse a que esta zona de la EQ3 podría aun presentar partes de su superficie externa con membrana celular y aun no cubierta con pared quística, lo cual se reflejaría en una imagen como la mostrada en la figura 17. Otra posible explicación podría ser la presencia de sales adsorbidas en la pared o membrana celular.

Caso contrario se observa en la figura 18 (imagen A y B), donde es evidente la homogeneidad de la superficie celular (color de la imagen), tanto en el caso de la membrana celular del trofozoíto (Fig. 18A) y la pared celular del quiste (Fig. 18B).

Se comparó de manera cuantitativa la elasticidad de la superficie celular de trofozoítos y de EQ4, donde como era de esperarse, la membrana celular de los trofozoítos muestran una mayor elasticidad que la que presenta la pared quística de las EQ4 (Figs. 19 y 20), es decir, la pared quística es más rígida que la membrana

celular. Estos resultados se explican porque la pared quística está formada del polímero de N-acetilglucosamina (quitina) y probablemente de otros componentes menores como sucede en *E. invadens* (Arroyo-Begovich, 1990) lo cual le brinda resistencia a agentes externos adversos que pueden matar fácilmente a la célula en su fase de trofozoíto.

El trabajo de adhesión fue mayor en las EQ4 que en los trofozoítos (Figs. 21 y 22), esto refleja que la punta del cantiléver requiere más fuerza para desprenderse de la pared quística que de la membrana celular; esto implica que la superficie de la pared del quiste es mas adhesiva que la superficie del trofozoíto, probablemente por la presencia de otros componentes menores como sucede en *E. invadens*, y asimismo esta característica de la superficie de la pared explica el porqué de la tendencia a formar agregados durante el proceso de enquistamiento tanto de *E. invadens* como de *E. histolytica*.

Los cambios morfológicos que atraviesa la célula en su superficie externa pueden ser mejor apreciados en las imágenes obtenidas por SEM.

Una de las cosas que se aprecia en las imágenes es que conforme la célula va avanzando en el proceso de diferenciación celular, tiene una tendencia a agruparse con otras células; es decir, generalmente los trofozoítos se encuentran aislados entre ellos, mientras que las EQ se encuentran generalmente en agregados. Esto también fue reportado anteriormente por Morales-Vallarta *et al.* en 1989 en *E. invadens* y también en *E. histolytica* por Barrón-González *et al.* en 2008.

La aparición de microfibrillas en la superficie externa de una EQ2 (figura 24) es uno de los argumentos para evidenciar la formación de una pared en la superficie externa de la célula. En el 2009 Anirban *et al.* evidencian en su modelo hipotético de formación de pared quística en *E. invadens* la aparición de microfibrillas de quitina entrecruzadas que forman una malla en la superficie externa de la célula hasta formar el quiste, esto con ayuda de algunas lectinas.

En base a estos resultados, evidenciamos que existen una serie de diferencias morfológicas distintivas entre los estadios que atraviesa *E. histolytica* en su proceso de diferenciación celular, cada una de las cuales es detallada en este trabajo.

Los resultados de este trabajo se suman a los esfuerzos por contribuir a la comprensión de los aspectos morfológicos que imperan en el proceso de diferenciación celular de *E. histolytica*, así como la comprensión de diversos procesos que se llevan a cabo en el interior de la misma célula que hacen posible la formación del quiste maduro.

Tomando en cuenta que el quiste maduro es el encargado de la diseminación de este padecimiento, consideramos que en un futuro es necesario continuar con las investigaciones sobre el proceso de diferenciación celular de *E. histolytica*, ya que esto aportará datos que pudieran ser utilizados para combatir la amibiasis.

## **9. CONCLUSIONES**

La pared del quiste es menos elástica, más rígida, más rugosa y con mayor adhesividad que la membrana celular

La formación de la pared del quiste ocurre a través de la formación de microfibrillas, probablemente de quitina, que se entrelazan formando una cubierta semejante a una red.

## LITERATURA CITADA

Aguilar-Díaz H, Díaz-Gallardo M, Laclette JP, Carrero JC. 2010. *In vitro* induction of *Entamoeba histolytica* cyst-like structures from trophozoites. PLoS Neglected Tropical Diseases 4 (2): e607

Anirban C, Ghosh S, Jang K, Bullitt E, Moore L, Robbins P, Samuelson J. 2009. Evidence for a “wattle and daub” model of the cyst wall of *Entamoeba*. PLoS Pathogens 5(7): e1000498.

Arroyo-Begovich A, Cárabez-Trejo A, Ruíz-Herrera J. 1980. Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. Journal of Parasitology. 66:735–741.

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

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

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

Barrón-González MP, Villareal-Treviño L, Verduzco-Martínez JA, Mata Cárdenas BD, Morales-Vallarta MR. 2008. *Entamoeba histolytica*: cyst-like structures *in vitro* induction. Experimental Parasitology 118:600-603.

Beaver P, Jung RC, Sherman JJ, Read TR, Robinson TA. 1956. Experimental *Entamoeba histolytica* infections in man. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 5, 1000-1009.

Beaver P, Jung R. 2003. Parasitología Clínica de Craig Faust. MDM Editorial. pp107-139.

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

Campos-Góngora E, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Mora- Galindo J, Said-Fernández S. 1997. Stimulation of *Entamoeba histolytica* cyst wall polysaccharide synthesis by three divalent cations. Archives of Medical Research 28: 141–142.

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

Chatterjee A, Ghosh S, Jang K, Bullitt E, Moore L, Robbins P, Samuelson J. 2009. Evidence for a “wattle and daub” model of the cyst wall of *Entamoeba*. *PLoS Pathogens* 5(7): e1000498.

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 Mex.* 9: 110-116.

Chávez-Munguía B, Omaña-Molina M, González-Lázaro M, González- Robles A, Cedillo-Rivera R. 2007. Ultrastructure of cyst differentiation in parasitic protozoa. *Parasitology Research* 100: 1169–1175.

Clark CG, Cunnick CC, Diamond LS. 1992. *Entamoeba histolytica*: its conversion of 'nonpathogenic' amebae to the 'pathogenic' form, a real phenomenon. *Experimental Parasitology* 74: 307-314.

Das SR, Rastogi AK, Sagar P, Singh MP. 1980. Axenic encystation of *Entamoeba invadens*. *Indian Journal of Experimental Biology* 18: 333-336.

Diamond LS. 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science* 134:336-337.

Diamond LS. 1986. *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903: from xenic to axenic cultivation. *Journal of Protozoology* 33:1-5.

Dobell C. 1928. Research on the intestinal protozoa of monkeys and man. *Parasitology* 20:357-412.

Eichinger D. 2001. A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48 (1): 17–21.

González-Salazar F, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez H, Campos-Góngora E, Mata-Cárdenas BD, Said-Fernández S. 2000. Identification of seven chemical factors that favor high-quality *Entamoeba histolytica* cyst-like structure formation under axenic conditions. *Archives of medical research.* 31: 192-193.

Guerrant RL. 1986. Amebiasis: introduction, current status and research questions. *Review of Infectious Disease* 8:218-227.

Huber M, Koller B, Gitler C, Mirelman D, Revel M, Rozenblatt S, Garfinkel L. 1989. *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Molecular and Biochemical Parasitology* 32:285-296.

Jarroll EL, Macechko PT, Steimle PA, Bulik D, Karr CD, Van Keulen H, Paget TA, Gerwin G, Kamerling J, Vliegenthart J, Erlandsen S. 2001. Regulation of carbohydrate metabolism during *Giardia* encystment. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 22–26.

Jones W R. 1946. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica* with a method for evaluating the antiamebic properties of new compounds. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 40:130-140.

Kucik CJ, Martin GL, Sortor BV. 2004. Common intestinal parasites. *American Familiar Physician* 69: 1161-1168.

Leippe M, Andra J, Muller-Eberhard HJ. 1994. Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of National Academy of Science USA* 91: 2602-2606.

Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology* 27:37-58.

López-Romero E, Villagómez Castro JC. 1993. Encystation in *E. invadens*. *Parasitology Today* 9:225-227.

Lushbaugh WB, Miller JH. 1988. The morphology of *Entamoeba histolytica*, In: Ravdin JI Editor, *Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons, Inc., New York. pp 41-68.

Macechko PT, Steimle PA, Lindmark DG, Erlandsen SL, Jaroll EL. 1992. Galactosamine-synthesizing enzymes are induced when *Giardia* encyst. *Molecular and Biochemical Parasitology* 56: 301-309.

Majumder S, Lohia A. 2008. *Entamoeba histolytica* encodes unique formins, a subset of which regulates DNA content and cell division. *Infection and Immunity* 76: 2368-2278.

Markell EK, Voge M, John DT. 1986. *Medical parasitology* 7th ed. WB Saunders Co., Philadelphia, Pa.

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

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

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

Morales-Vallarta M, Villarreal-Treviño L, Guerrero-Medrano L, Ramírez-Bon E, Navarro-Marmolejo L, Saíd-Fernández S, Mata-Cárdenas BD. 1997. *Entamoeba invadens*, differentiation and *Entamoeba histolytica* cyst-like formation induced by CO<sub>2</sub>. *Archives of Medical Research* 28:150-151.

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

Petri WA, Jackson TF, Gathiram V, Kress K, Saffer LD, Snodgrass TL, Chapman MD, Keren Z, Mirelman D. 1993. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose specific adherence lectin. Infection and Immunity 58:1802-1806.

Proctor EM, Gregory MA. 1973. Ultrastructure of cyst of *E. histolytica*. International Journal for Parasitology 3:455-456.

Pumarola A, Rodríguez A, García J, Piedrola A. 1991. Microbiología y Parasitología Médica. 2ª ed. Editorial científica y técnica, S.A. Barcelona, España. p 915.

Ravdin JI. 1995. State of the art clinical article. Clinical Infectious Disease, 20:1453-1466.

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

Rivera PR, Correa-Lemus I. 1986. Enquistamiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*. Archivos de Investigación Médica. Mex. 17:19-23.

Romero R. 1993. Microbiología y Parasitología Humana, Editorial Médica Panamericana, México D.F.

Romero Caballero R. 1994. "Introducción a la amibiasis, Segunda reunión de expertos". SEARLE, México D.F.

Samuelson J, Acuna-Soto R, Reed S, Biagi F, Wirth D. 1989. DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*. Journal of Clinical Microbiology 27:671-676.

Saíd-Fernández S, Vargas-Villareal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas B, Navarro-Marmolejo L, Lozano Garza G, 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, Campos-Góngora EJ, González-Salazar F, Martínez-Rodríguez HG, Vargas-Villareal J, Viader-Salvadó. 2001. Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and Co<sup>2+</sup> stimulate *Entamoeba histolytica* to produce chitin-like material. Journal of Parasitology 87:917-923.

Shen Z, Jacobs-Lorena M. 1999. Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates. Journal of Molecular Evolution 48:341-347.

Silverman JD, Clarck CG, Diamond LS, Sagin ML. 1999. Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small subunit ribosomal, RNA genes sequence analysis. *Molecular Biology Evolution* 16:1740-1751.

Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet* 2003;361:1025–1034.

Van Dellen K, Ghosh SK, Robbins PW, Loftus B, Samuelson J. 2002. *Entamoeba histolytica* lectins contain unique 6-Cys or 8-Cys chitin-binding domains. *Infection and Immunity* 70: 3259–3263.

WHO. WHO/PAHO/UNESCO report. 1997. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico, 28–29 January, 1997. *WHO Epidemiology Bulletin* 18:13–14