

1. RESUMEN

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

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

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

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

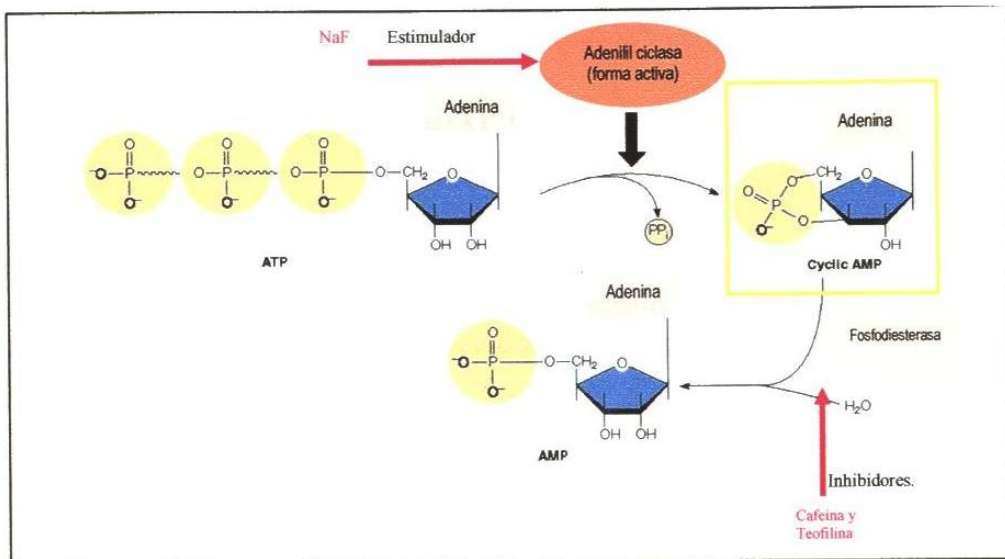


Figura 5. Sitios de acción de la cafeína, teofilina y NaF en el metabolismo del AMPc. La síntesis del AMPc es inducido por la adenililciclase la cual es estimulada por el NaF, en tanto que es degradada por la fosfodiesterasa, la cual es inhibida por la cafeína y la teofilina.

5.12. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN

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

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

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 ORIGEN DE LOS REACTIVOS

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

Tabla IV
Origen de los reactivos

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

6.2 MATERIAL BIOLÓGICO

6.2.1 Cepas de *Entamoeba*

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

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

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

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

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

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

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

6.3 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

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

- 6.3.13 Citrato de plomo.** Se preparó una solución inicial con 9 mL de agua descarbonatada y 1 mL de solución NaOH 1N, en la que se disolvieron 0.03g de citrato de plomo. Se guardó en refrigeración en recipiente ámbar.
- 6.3.14 Calcoflúor M2r 1.0%.** Se pesó 0.1 g de calcoflúor y se aforó a 10 mL con agua destilada.
- 6.3.15 Colorante tricrómico de Gomori.** Se pesaron 0.6g de cromotrofo 2R, 0.15g de verde claro SF, 0.15g de verde rápido FCF, se mezclaron los colorantes con 0.1 mL de ácido acético glacial, se dejaron reposar 30min, enseguida se disolvieron en 100 mL de agua destilada (se usa sin diluir).
- 6.3.16 Fijador (solución de Shaudinn).** Se toma 1 volumen de alcohol etílico al 95%, y se toman 2 volúmenes de la solución acuosa saturada de cloruro de mercurio; antes de su uso se añaden 5 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL de solución.
- 6.3.17 Formalina al 10%.** Se mezclaron 9 partes de agua destilada y una parte de formaldehído comercial (37-40%) a temperatura ambiente. Para preservar quistes, por cada parte de la muestra se agregaron 5 partes de formalina al 10%.
- 6.3.18 Glutaraldehído al 2.5%.** Se disolvió el contenido de un frasco ampula con 1 mL de glutaraldehído al 25% en 90 mL de buffer de fosfatos 0.2M, pH 7.2 para obtener una solución final al 2.5%.
- 6.3.19 Hidóxido de sodio 10 N.** Se disolvieron 40 g de NaOH en 100 mL de agua destilada
- 6.3.20 Histamina 0.6 mM.** Se disolvieron 0.05 mg de histamina en 25 mL de agua bidestilada desionizada.
- 6.3.21 Percoll (Sigma).** A la solución stock de Percoll (100%), se le ajustó la osmolaridad a 230 mOsm/Kg H₂O adicionando una parte de PBS 10X a nueve partes de Percoll, diluciones posteriores se realizaron en solución salina y se almacenó a 4°C hasta su uso.
- 6.3.22 Resina Spurr (Spurr, 1969).** Se pesaron 10g de dióxido de vinil ciclohexano, 6g de éter de propilenglicol diglicidil (DER), 26g de anhídrido nenenil succínico (NSA) y 0.4g de dimetil aminoetanol (DMAE). Los componentes se mezclaron evitando que se formaran burbujas.
- 6.3.23 Sarcosyl 0.15%.** Se pesaron 0.15g de sarcosyl y se aforaron a 100 mL con agua destilada.

- 6.3.24 Solución acuosa saturada de cloruro de mercurio.** Se pesaron 140 g de cristales de cloruro de mercurio, se disolvieron en 1 L de agua destilada. Se disuelve el cloruro de mercurio en el agua por calentamiento, se deja enfriar la mezcla. El exceso de cloruro de mercurio se decantó y se filtró la solución sobrenadante con papel Watman No.1, la solución transparente se guardó en un frasco de vidrio con tapón.
- 6.3.25 Solución de hidróxido de sodio 1 N.** Se disolvió 0.01g de NaOH en 2.5 mL de agua descarboxonada.
- 6.3.26 Solución de penicilina-estreptomina**
- a) solución concentrada de penicilina:** A un frasco ampula de 1,000,000 U de Penicilina-G sódica cristalina, se le inyectaron 5.0 mL de agua bidestilada estéril con aguja y jeringa estéril para disolver la penicilina.
 - b) solución patrón de penicilina-estreptomina:** A un frasco ampula de sulfato de estreptomina, se le añadieron bajo condiciones de esterilidad, la solución concentrada de penicilina y se mezclaron.
 - c) solución de trabajo de penicilina-estreptomina (1000 X):** Se transfirió asépticamente toda la solución patrón de penicilina-estreptomina del frasco ampula en una probeta estéril de 25 mL y se aforó a 20 mL con agua bidestilada estéril. Se almacenó a -20°C en alícuotas de 5 mL en tubos de 13 x 100 mm. cubiertos con papel aluminio.
- 6.3.27 Solución salina fisiológica.** Se disolvieron 0.85 g de NaCl en 100 mL de agua destilada
- 6.3.28 Solución decolorante.** Se mezclaron 25 mL de metanol, 35 mL de ácido acético y se aforaron a 500 mL. Se almacenó a temperatura ambiente
- 6.3.29 Sulfato de zinc ($\delta=1.18$ g/mL).** Se disolvieron 331g de ZnSO₄ en un litro de agua destilada tibia, se filtró en papel Watman No.1, posteriormente se determinó la densidad, en caso de que esta sea inferior a 1.18 g/mL, se añadió más ZnSO₄, y cuando el valor fue mayor se agregó agua). Para muestras fijadas con formalina se preparó a una densidad de 1.20 g/mL.
- 6.3.30 Tetróxido de osmio OsO₄ 1%.** Se disolvieron 0.25 g de OsO₄ en 25 mL de buffer de fosfatos 0.12 M quedando a una concentración final de 1%
- 6.3.31 Tritón X-100 al 1%.** Se disolvió 1.0 mL de tritón X-100 en agua destilada y se aforó a 100 mL.
- 6.3.32 Tris-glicina 5X (500 mL).** Se pesaron 7.55 g de Tris base, 47.0 g de glicina, se mezclaron con SDS al 10% y se aforó a 25 mL.

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

6.4 MEDIO DE CULTIVO

6.4.1 Preparación del medio TYI-S-33

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

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

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

6.5 MÉTODOS

6.5.1 Mantenimiento de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS

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

6.5.2 Cinéticas de crecimiento de *Entamoeba histolytica*

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

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

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

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

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

6.5.4.1 Diseño experimental

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

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

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

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

El modelo utilizado fue:

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

Donde:

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

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

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

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

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

Tabla VI

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

		Etapas																			
		Primera etapa										Segunda Etapa									
Número de bioensayo	Glucosa	Suero 1 mL	Antibiótico (0.1 mL)	CO ₂	Tiempo de gaseo (min)	pH	Tiempo incubación 37°C (días)	Medio condicionado con Enterobacterias (3 mL x 2)		Glucosa	Suero 1 mL	Antibiótico (0.1 mL)	Bilis 1 mL	Histamina 0.6mM (0.6 mL)	CO ₂	Tiempo de gaseo (min)	pH	Tiempo incubación 37°C (días)			
								<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>												
1	-	+	+	+	2	7	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
2	-	+	+	+	2	9	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
3	-	+	+	-	-	7	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
4	-	+	+	-	-	9	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
5	+	+	+	+	2	7	3	-	-	-	+	+	-	-	+	2	7	4			
6	+	+	+	+	2	7	3	-	-	-	+	+	-	-	+	2	9	4			
7	+	+	+	+	2	7	3	-	-	-	+	+	-	-	+	2	7	4			
8	+	+	+	+	2	7	3	-	-	-	+	+	-	-	+	2	9	4			
9	+	+	+	+	2	7	3	-	-	-	+	+	-	-	+	2	7	4			
10	+	+	+	+	2	7	3	-	-	-	+	+	-	-	+	2	9	4			
*11	+	+	+	+	2	7	3	+	+	-	+	+	-	-	+	2	7	4			
*12	+	+	+	+	2	7	3	+	+	-	+	+	-	-	+	2	9	4			
13	+	+	+	+	2	7	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
14	+	+	+	+	2	7	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
15	+	+	+	+	2	7	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
16	+	+	+	+	2	7	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
17	+	+	+	+	2	9	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
*18	-	+	+	+	2	9	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
19	+	+	+	+	2	9	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

* La segunda etapa del método de alta tensión de CO₂ se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer conteniendo 30 mL de medio y se adicionó con 15 mL de medio condicionado de cada una de las enterobacterias, 3 mL de suero, 0.3 mL de antibiótico, 1.8 mL de histamina [0.6mM] y se gasearon con CO₂/ 6 min.
 Δ Sólo se emplearon las sales a partir de la composición original (Tabla V)

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

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

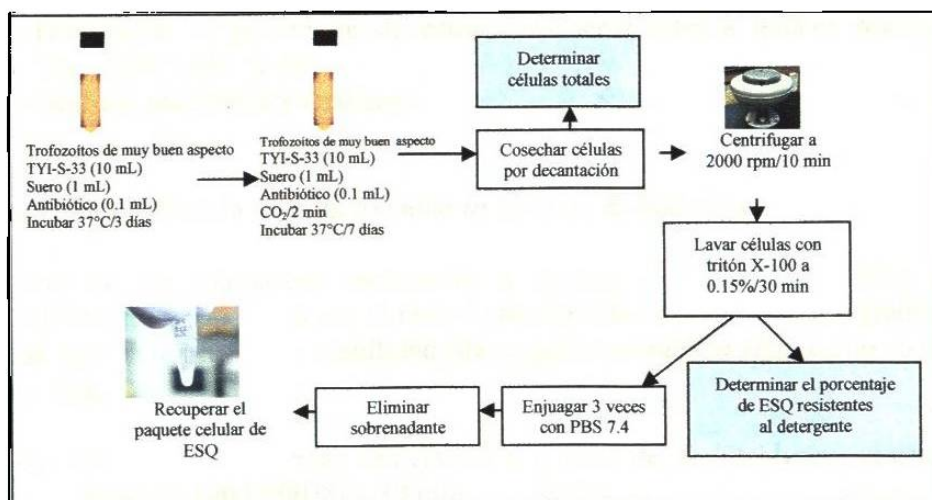


Figura 6. Estrategia experimental para obtener estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. La estrategia consiste básicamente el empleo de trofozoítos en óptimas condiciones, gaseados con CO₂ e incubados a 37°C/ 7 días y una vez transcurrido este tiempo se obtienen abundantes estructuras semejantes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

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

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

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

- 3.-Centrifugar a 1,500 rpm/5 min, eliminar el sobrenadante y reservar el paquete celular.
- 4.-Lavar las células con PBS pH 7.4.
- 5.-Centrifugar a 1,500 rpm/5 min.
- 6.-Eliminar el sobrenadante y reservar el paquete celular.
- 7.-Agregar al paquete celular 10 mL de TYI-S-33.
- 8.-Determinar las células/mL.
- 9.-Inocular 2×10^4 cél/mL en 70 tubos de borosilicato con tapón de rosca de 18x150mm conteniendo 15 mL de medio TYI-S-33 adicionado con 1.5 mL de suero y 0.15 mL de antibiótico (mezcla de penicilina-estreptomicina).
- 10.-Gasear cada tubo con CO₂/2 min (99.9% grado de pureza).
- 11.-Incubar a 37°C por 7 días.
- 12.-Cosechar las estructuras semejantes a quiste por 7 días, cada 24 h, enfriando cada tubo en agua-hielo a 0-4°C/15 min.
- 13.-Determinar las células totales.
- 14.-Verter el volumen total en un tubo cónico y centrifugar a 2000 rpm/10 min.
- 15.-Eliminar el sobrenadante y reservar el paquete celular.
- 16.-Retar células al detergente tritón X-100 al 0.15% /30 min.
- 17.-Determinar el porcentaje de estructuras semejantes a quistes resistentes al detergente tritón X-100.
- 18.-Graficar resultados y analizar.

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

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

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

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

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

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

6.5.6. Separación por gradiente discontinuo de Percoll

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

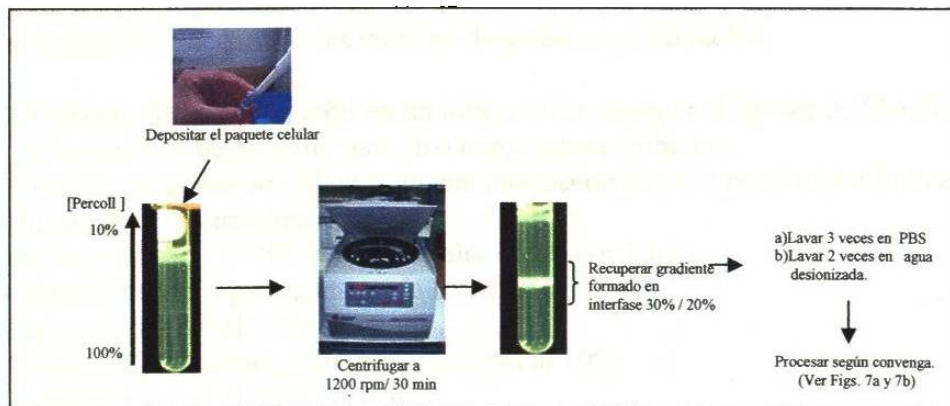


Figura 7. Separación de células por gradiente discontinuo de percoll. Para separar las estructuras semejantes a quistes y quistes de *E. histolytica* empleamos la técnica de gradiente discontinuo de percoll.

6.5.7 Tinciones

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

6.5.7.1 Pared celular (tinción especial)

La muestra se fijó con glutaraldehído y posteriormente se observó a microscopía de fluorescencia, para lo cual una gota de esta muestra fue colocada sobre un portaobjetos y sobre esta se agregó una gota de calcoflúor M2R al 1% y se observó inmediatamente con luz U.V. empleando un Microscopio confocal láser con un microscopio Olympus1X70 usando el canal de detección BA51OIF con 494nm. **Nota:** Como testigo empleamos quistes de *Entamoeba invadens*, los cuales produjimos *in vitro* empleando el Método de Alta Tensión de CO₂ (Morales, 1991).

6.5.7.2 Núcleos (tinción especial)

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

6.5.7.3 Citoplasma y núcleo (tinción diferencial)

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

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

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

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

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

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

6.5.8 Microscopía

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

6.5.8.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

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

6.5.8.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

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

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

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

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

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

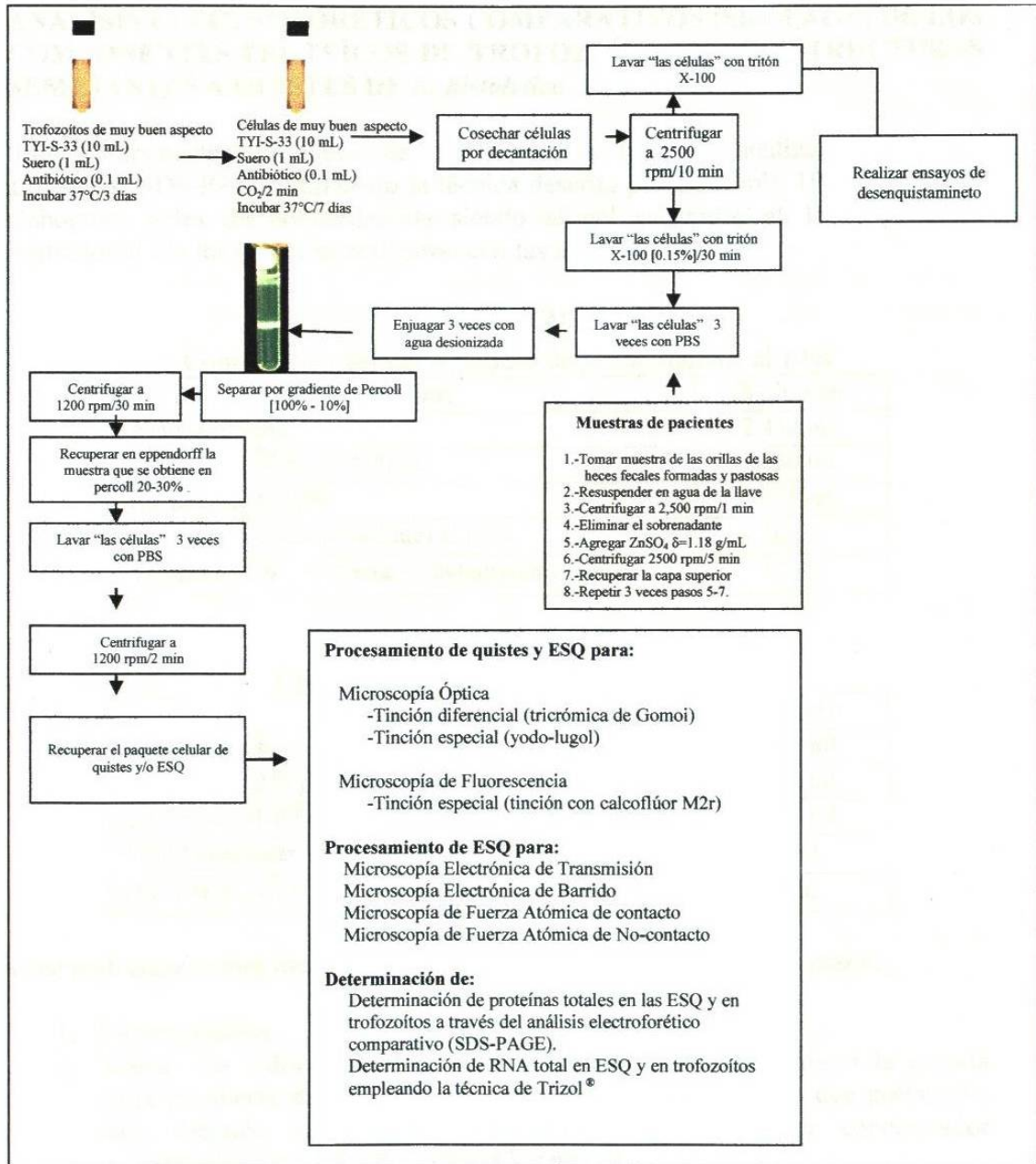


Figura 8. Estrategia experimental general. Esta estrategia fue empleada para procesar estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* obtenidas bajo condiciones axénicas *in vitro*.

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

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

Tabla VII

Composición del gel separador de poliácridamida al 10%

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

Tabla VIII

Composición del gel concentrador al 5%

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

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

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

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

6.7 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL AMIBIANO POR EL MÉTODO TRIZOL®

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

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

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

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

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

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

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

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

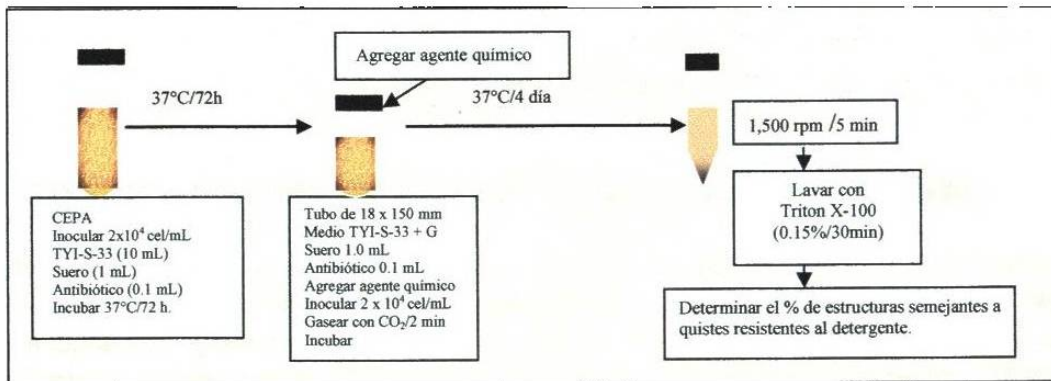


Figura 9. Estrategia experimental para determinar el efecto de agentes químicos sobre el proceso de diferenciación de *E. histolytica* in vitro. Una vez determinada la CI_{50} de cada agente químico se llevó a cabo la evaluación de su efecto sobre el proceso de diferenciación, siendo agregado cada agente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

6.8.2 Análisis estadístico

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

ABSTRACT

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

2. INTRODUCCIÓN

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

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



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

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

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

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

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

3. HIPÓTESIS

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

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

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

4.2. Objetivos particulares

- 1.-Obtener la cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS bajo condiciones axénicas.
- 2.-Realizar ensayos de enquistamiento de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS, bajo condiciones axénicas.
- 3.-Describir los cambios en la ultraestructura durante la diferenciación *in vitro* de *Entamoeba histolytica*.
- 4.-Describir los cambios en la pared celular durante la diferenciación *in vitro* de *Entamoeba histolytica*.
- 5.-Realizar ensayos de desenquistamiento de *Entamoeba histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*.
- 6.-Inducir y describir el ciclo de vida axénico de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS *in vitro*
- 7.-Realizar el análisis electroforético comparativo SDS-PAGE de los componentes protéicos de trofozoítos y estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*.
- 9.-Cuantificar el RNA total en trofozoítos y estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* mediante la técnica de Trizol[®].
- 10.-Determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) sobre trofozoítos de *E. histolytica* de la cafeína, teofilina, NaF, extracto metabólico de *Castela texana* y metronidazol.
- 11.-Evaluar el efecto de la CI₅₀ de la cafeína, extracto metanólico de *Castela texana*, NaF y teofilina sobre el enquistamiento axénico de *Entamoeba histolytica* *in vitro*.

5. ANTECEDENTES

5.1. AMIBIASIS

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

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

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

5.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

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

Tabla I

Clasificación taxonómica de *E. histolytica*

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

5.3. EPIDEMIOLOGÍA

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

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

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

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

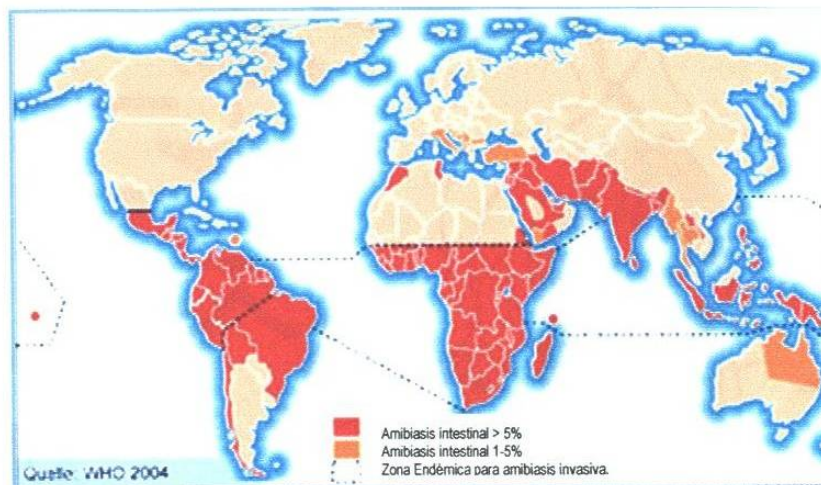


Figura 2. Distribución mundial de la amibiasis. En la mayoría de los países tercermundistas la amibiasis intestinal afecta a más del 5% de la población, en tanto que en el resto de estos países la amibiasis intestinal fluctúa entre el 1 y 5 %.

5.4. CICLO DE VIDA DE *Entamoeba histolytica*

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

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

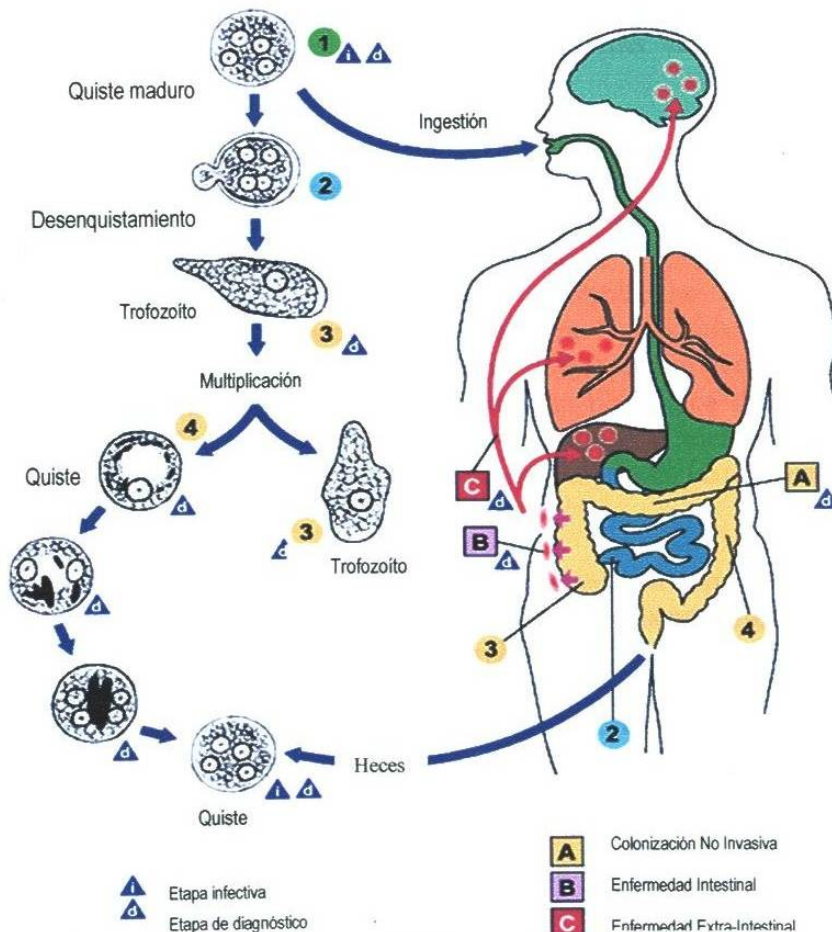


Figura 3. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. 1.-Los quistes maduros tetranucleados son eliminados a través de las heces y son ingeridos a través de agua o alimentos contaminados, 2.-El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado, 3.-A partir de cada quiste emergen ocho trofozoítos metaquísticos,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

5.5. BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE *Entamoeba histolytica*

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

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

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

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

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

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

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

5.6.1. Métodos de cultivo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.6.2. Métodos de Enquistamiento

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

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

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

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

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

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

Tabla II

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

Autor	Fecha	Tipo de medio	Condición	Descripción
Dobell y Laidlaw	1926	Difásico (Base de huevo/harina de arroz/ sol. de Locke) Medio LE de Boeck&Drbohlav	Xénica	Consiste en cultivar <i>E. histolytica</i> en medio que no contienen almidón de arroz por varios pases, después de lo cual se añade el almidón de arroz al medio de cultivo. Resultados inciertos
Cleveland y Sanders	1930	Difásico (Agar/harina de arroz/ solución de Locke)	Xénica	Para un buen resultado en el enquistamiento recomiendan el uso de abundantes amibas, la presencia de harina, almidón o polvo de arroz en el medio para alimentar a las amibas y la presencia de bacterias en el medio.
Stone, W.S.	1935	Monofásico (Medio suero-huevo-solución de Locke)	Xénica	Reportó un medio para enquistar a <i>E. histolytica</i> el cual consistía de sales inorgánicas (solución de Locke modificada) y adicionado con suero de caballo.
Kessel <i>et al.</i>	1944	Difásico	Xénica	Modificaron el medio de Cleveland y Sanders
Zuckman y Melenay.	1945	Monofásico	Xénica	Reportaron abundante producción de quistes bajo una atmósfera reducida en un medio líquido. Cepa: NIH
Chang.	1946	Difásico (Base de huevo/harina de arroz/ sol. de Locke) Medio LE de Boeck&Drbohlav	Xénica	Reportó el papel que tiene el pH y el potencial de oxido-reducción, dedujo que las mejores condiciones para el enquistamiento se presentan en un rango de pH bajo (6.4 a 6.8)
Rivera P.R. y Correa-Lemus, I.	1986	Monofásico Medio TYI-S-33	Axénicas	Modificaron el medio TYI-S-33 (Diamond, 1978) al adicionarle TYI-S-33.
Mata-Cárdenas, B. D. & Saiz-Fernández, S.	1986 1993	Monofásico Medio PEHPS	Axénica	En este medio se induce la formación de estructuras quísticas metabólicamente activos pero "con una pared anormal e inmadura" sin llegar a formar verdaderos quistes. Cepa HK-9
Nayeen M. A.	1993	Difásico (Base de huevo Solución de Loeck) Medio LE	Axénica	Empleando el medio de Boeck y Drbohlav adicionado con glucosa e histamina se obtienen altos porcentajes de quistes (60-74%).
Morales-Vallarta, M., <i>et al.</i>	1997	Monofásico Medio TYI-S-33 o PEHPS	Axénica	En este método de se involucran alta tensión de CO ₂ , suero de bovino y ayuno de glucosa, se produce formas semejantes a quistes con paredes imperfectas, sin embargo su estructura interna presenta algunas características semejante a un quiste maduro de <i>E. histolytica</i> . Cepa: HM1-IMSS
Campos-Góngora, E., <i>et al.</i>	2004	Monofásico Medio PEHPS	Axénica	El medio PEHPS es enriquecido con los iones Mn ⁺² , Mg ⁺² y Co ⁺² los que favorece la síntesis de quitina.
Clark C.G. y Diamond, I.S.	2002	Difásico (Base de huevo/harina de arroz/ sol. de Locke) Medio LE de Boeck & Drbohlav	Xénica	Método y resultados semejantes a los reportado por Dobell y Laidlaw en 1926.

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

5.7. PARED CELULAR DE QUISTES DE *Entamoeba*

5.7.1 Composición

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

5.7.2. Estructura

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

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

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

5.8. QUITINA

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

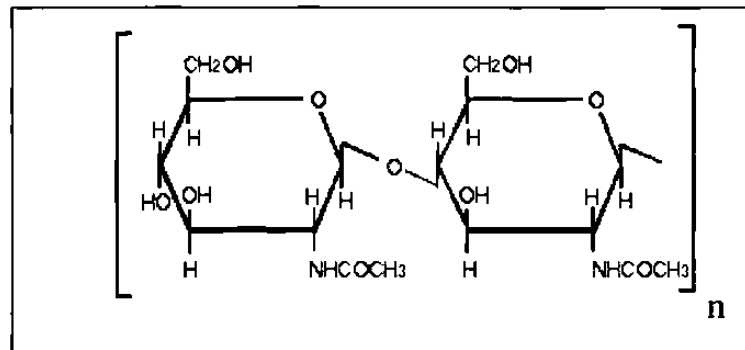


Figura 4. Estructura química de la quitina. Polímero de N-acetilglucosamina que muestra el enlace $\beta(1-4)$.

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

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

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

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

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

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

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

5.9. DESENQUISTAMIENTO DE *Entamoeba histolytica*

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

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

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

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

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

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

5.10 ULTRAESTRUCTURA DE TROFOZOÍTOS Y QUISTES DE *Entamoeba*

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

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

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

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

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

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

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

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

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