

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

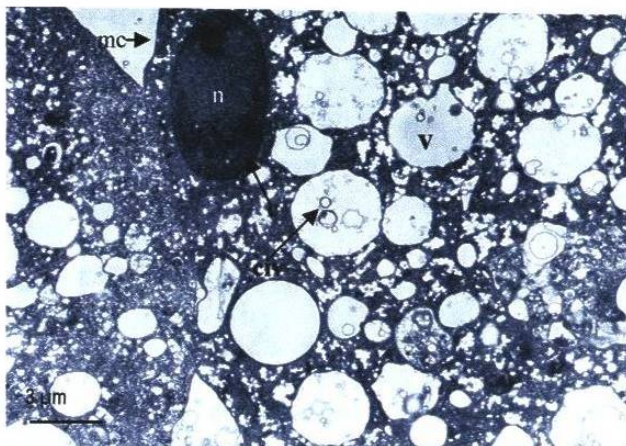


Figura 23. Micrografía electrónica de una sección de dos células de *E. histolytica*. Células cultivadas por 4 días en TYI-S-33 bajo condiciones de alta tensión de CO₂. Las células se encuentra delimitada por la membrana celular (mc) la cual se observa de borde regular, en una de ellas el núcleo (n)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

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

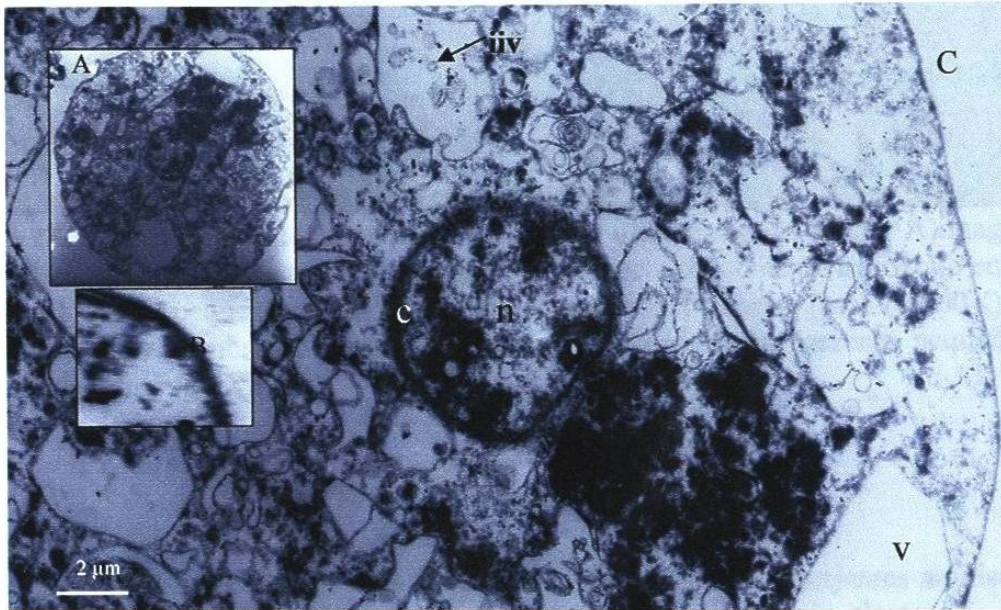


Figura 24. Micrografías electrónicas de una célula de *E. histolytica*. Célula cultivada en el medio TYI-S-33 a 37°C por 7 días en presencia de alta tensión de CO₂. En A se observa una estructura redondeada semejante a un quiste, presenta un núcleo (n) con la cromatina (c) adherida a la periferia de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

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

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

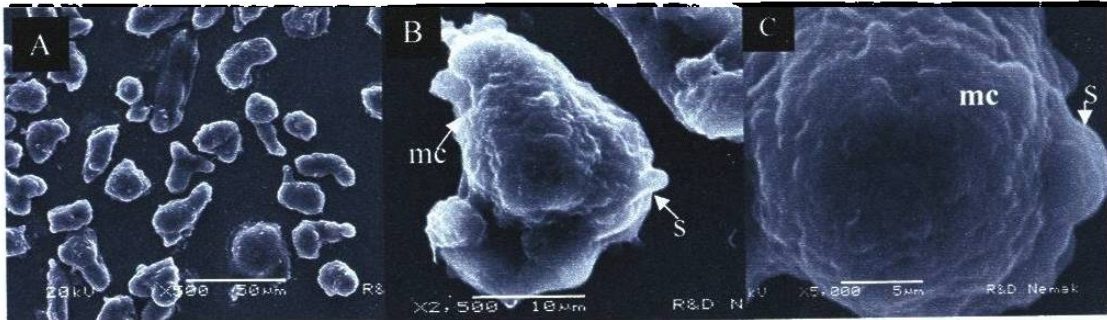


Figura 25. Aspecto de trofozoítos de *E. histolytica* observados al MEB. A) imagen panorámica de un grupo de trofozoítos (500X), B) aspecto típico de un trofozoíto en el cual se observan pequeños pseudópodos (s) y membrana celular (mc) (2,500X) y C) detalles de la membrana celular (mc) de un trofozoíto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

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

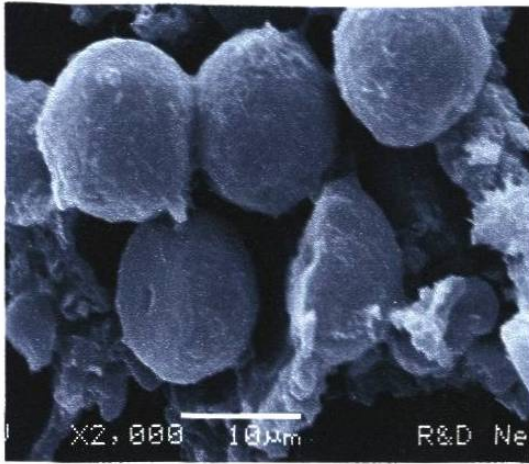


Figura 26. Agregado de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. Las ESQ muestran una topografía ligeramente rugosa.

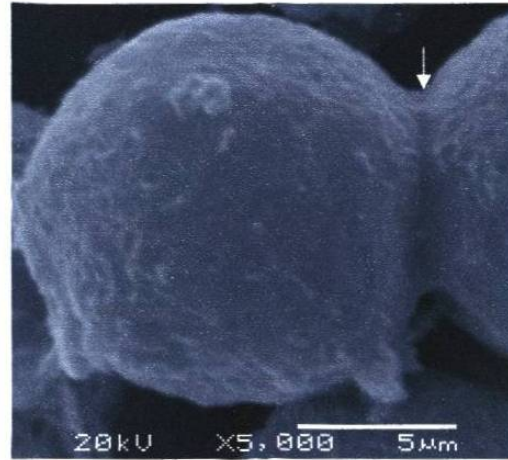


Figura 27. Estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. ESQ unidas a través de una pared que se prolonga de una estructura quística a otra (flecha).



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

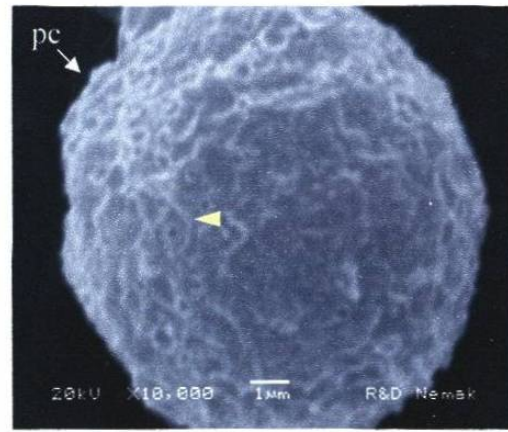


Figura 29. Topografía de la pared celular (pc) de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica*. La pared celular se aprecia de bordes rugosos e irregulares formados por una red de fibrillas (cabeza de flecha).

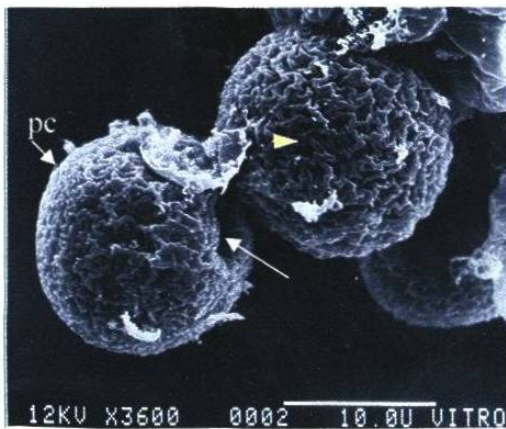


Figura 30. Quistes de *Entamoeba invadens*. La pared celular (pc) se observa formada por fibrillas (cabeza de flecha), también se observa una hendidura (flecha). (Imagen tomada de Morales, 1989)

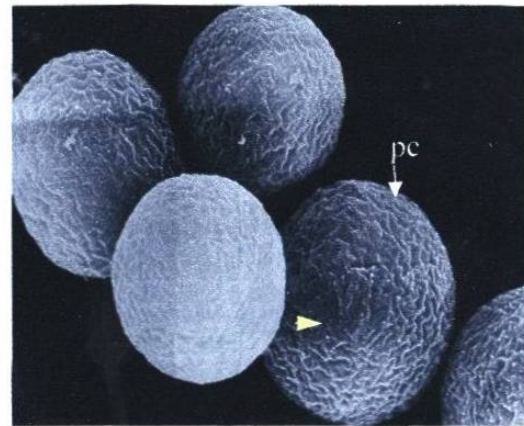


Figura 31. Topografía de un agregado de quistes de *E. histolytica*. La pared celular (pc) se observa de bordes rugosos e irregulares formados por una red de fibrillas (cabeza de flecha). (Imagen tomada de Martínez, 1987)

7.7.2.1 Análisis semicuantitativo

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

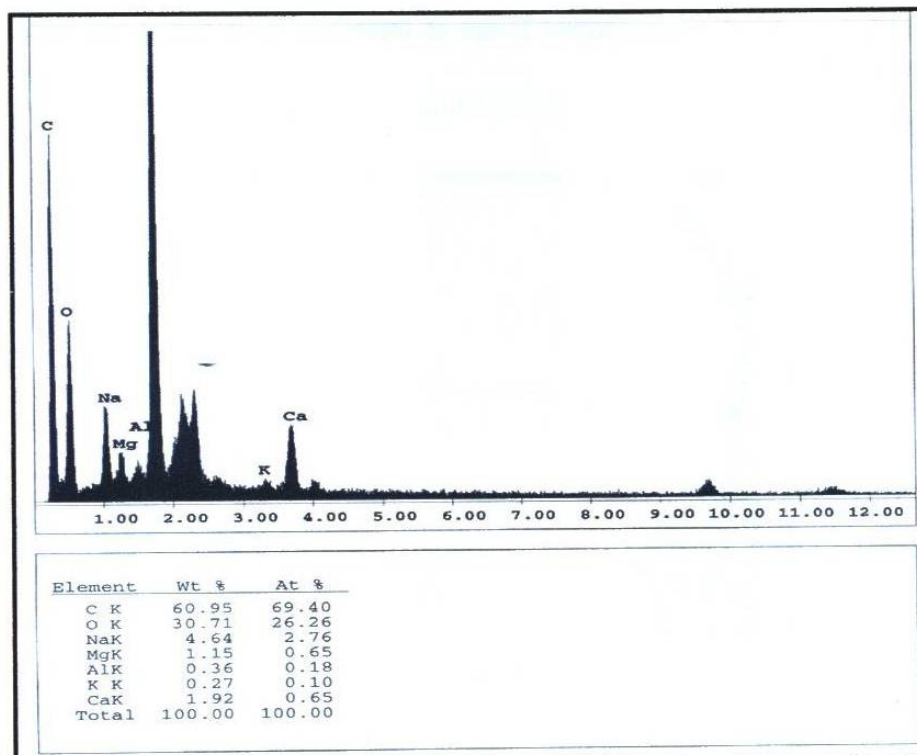


Figura 32. Análisis semicuantitativo de la pared celular de una ESQ. A través del MEB se realizó el análisis semicuantitativo de la pared celular de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica* resistente al detergente tritón X-100.

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

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

7.7.3.1 MFA de contacto intermitente o tapping

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

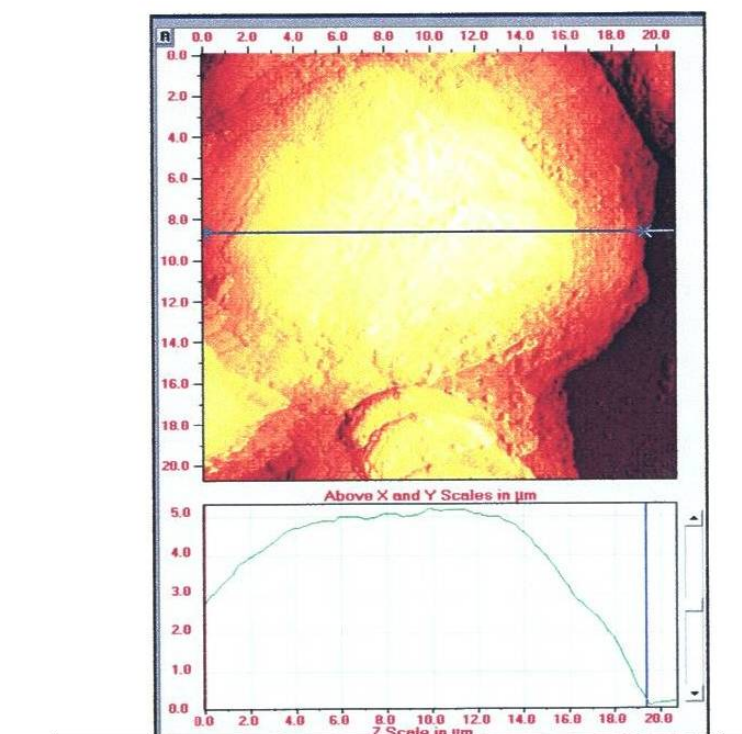


Figura 33. Análisis bidimensional de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica*. El análisis bidimensional de una ESQ obtenida *in vitro* fue observada a través de MFA de Contacto intermitente o tapping, la topografía muestra una pared rugosa con una serie de relieves a diferente profundidad.

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

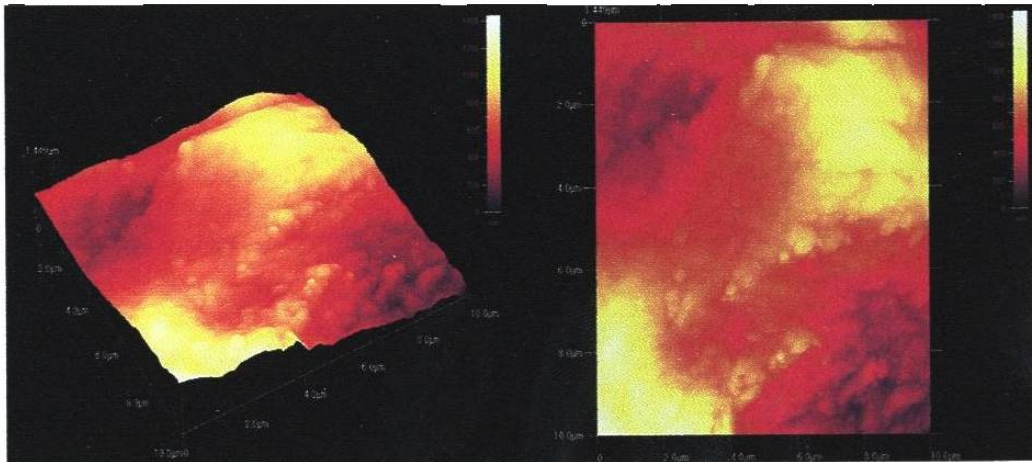


Figura 34. Análisis topográfico de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica*. Una sección de la superficie de una estructura quística de *E. histolytica* fue observada al MFA de Contacto intermitente o tapping, el análisis topográfico muestra la pared celular rugosa.

7.7.3.2 MFA de No-contacto

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

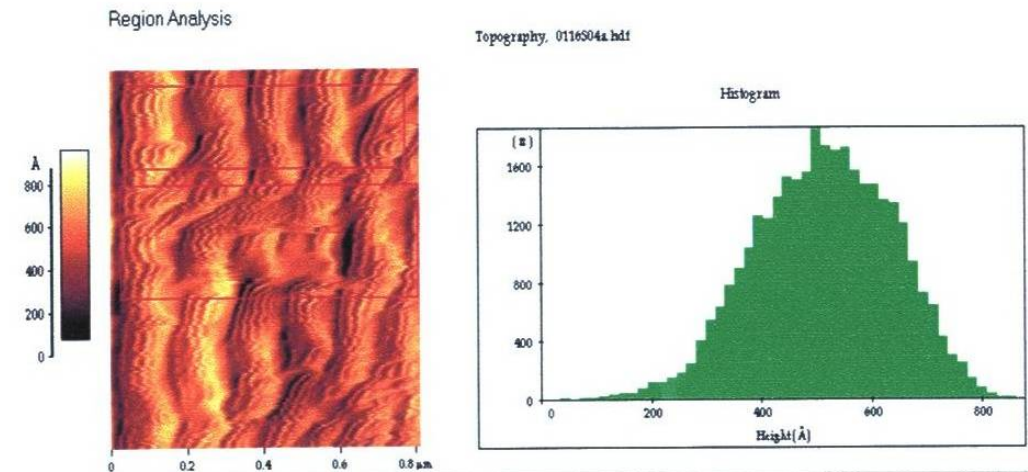


Figura 35. Análisis topográfico de una estructura semejante a quiste de *E. histolytica* a través de microscopía de fuerza atómica de No-contacto. Determinación de altura de “micropliegues” en la superficie de la pared celular de una estructura quística de *E. histolytica* obtenida *in vitro* observada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

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

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

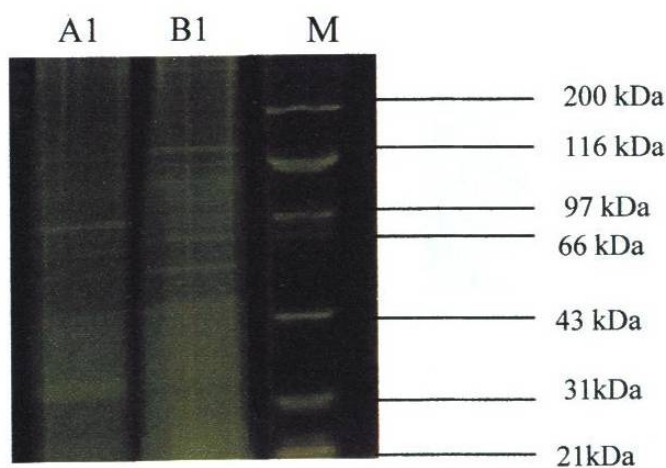


Figura 36. Patrón electroforético de proteínas totales de *E. histolytica*. A1) trofozoítos de *E. histolytica* cosechados a 72 h de incubación a 37°C, B1) estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica* M) marcador de proteínas observados en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

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

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

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

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

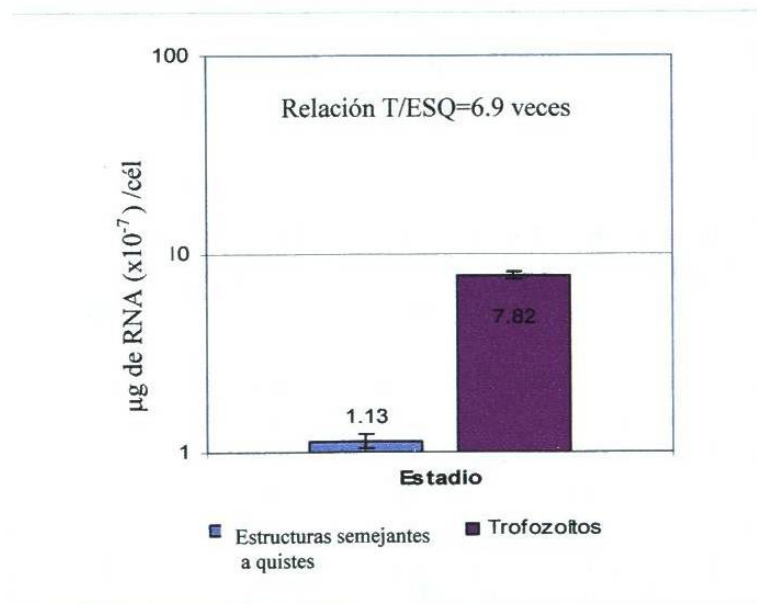


Figura 37. Cuantificación de RNA total en trofozoitos y estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. La relación de RNA total en trofozoitos es 6.9 veces mayor que en las estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*.

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

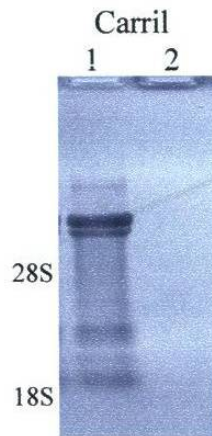


Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de RNA total. En el carril 1 se corrió muestra de RNA total de trofozoítos y en el carril 2 se corrió muestra de RNA total obtenida de estructuras semejantes a quistes, el RNA total fue extraído por el Método de Trizol®. En el carril 1 se observa claramente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

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

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

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

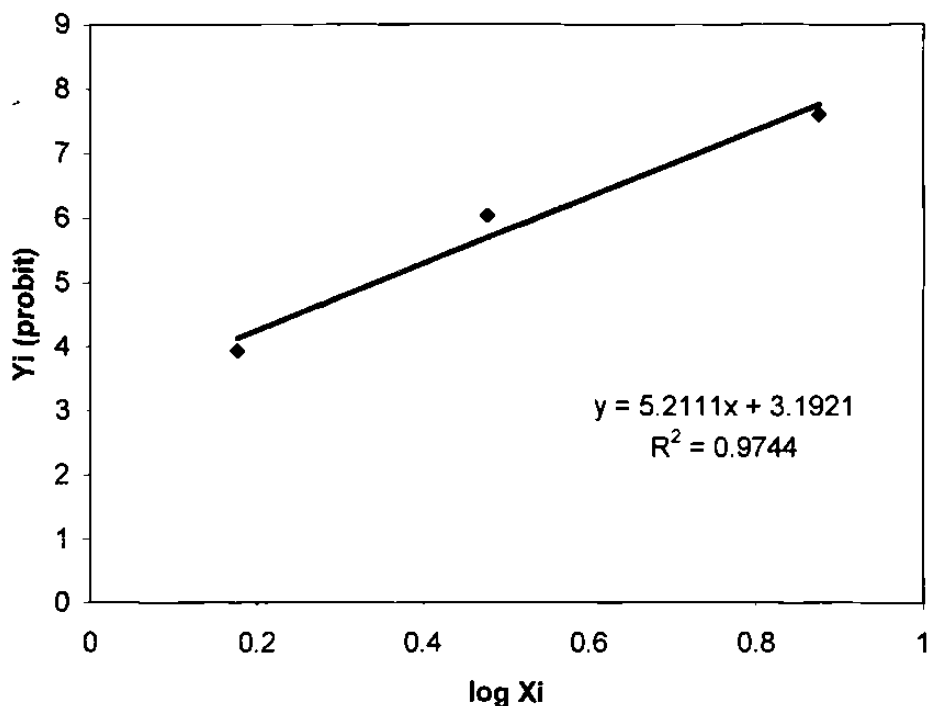


Figura 39. Diagrama de dispersión de las variables Y_i probit y $\log X_i$ del bioensayo de teofilina sobre cultivos de *E. histolytica*. A partir de las concentraciones evaluadas se obtuvo una R^2 0.97, valor de alta confiabilidad y de acuerdo a la ecuación obtenida se calculó el valor probit .

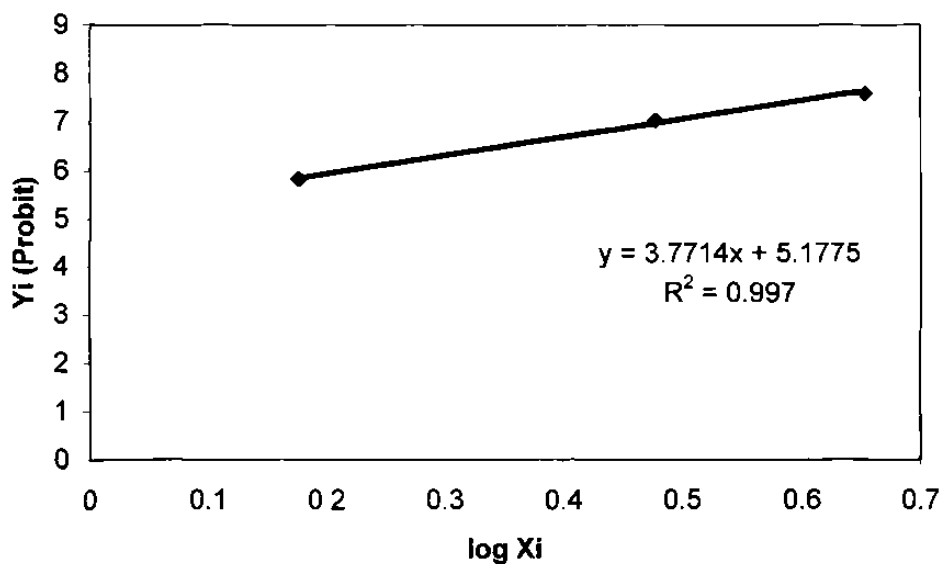


Figura 40. Diagrama de dispersión de las variables Y_i probit y $\log X_i$ del bioensayo de fluoruro de sodio (NaF) sobre cultivos de *E. histolytica*. A partir de las concentraciones evaluadas se obtuvo una R^2 0.99, valor de alta confiabilidad y de acuerdo a la ecuación obtenida se calculó el valor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

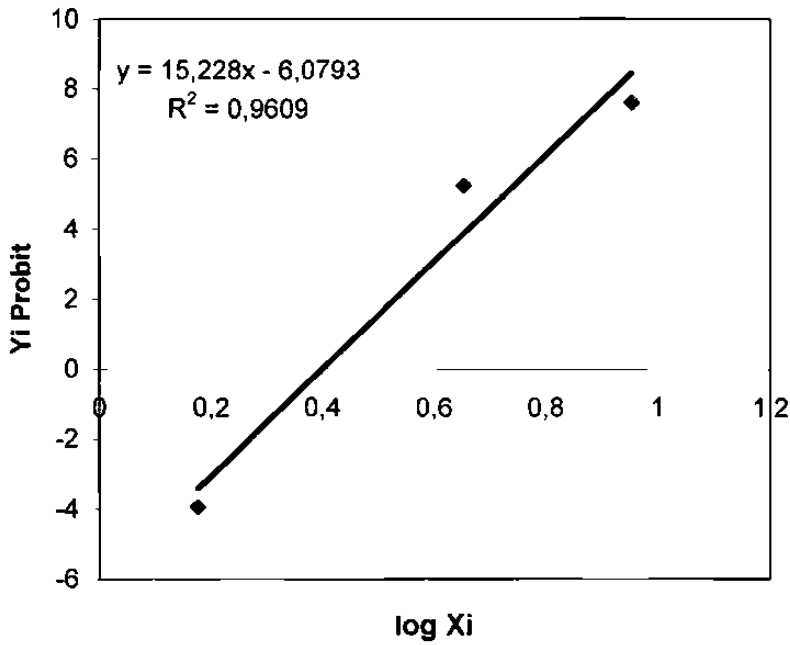


Figura 41. Diagrama de dispersión de las variables Yi probit y log Xi del bioensayo de la cafeína sobre cultivos de *E. histolytica*. En este ensayo se obtuvo una $R^2 = 0.96$, valor de alta confiabilidad y de acuerdo a la ecuación obtenida se calculó el valor probit empleando las tablas B.

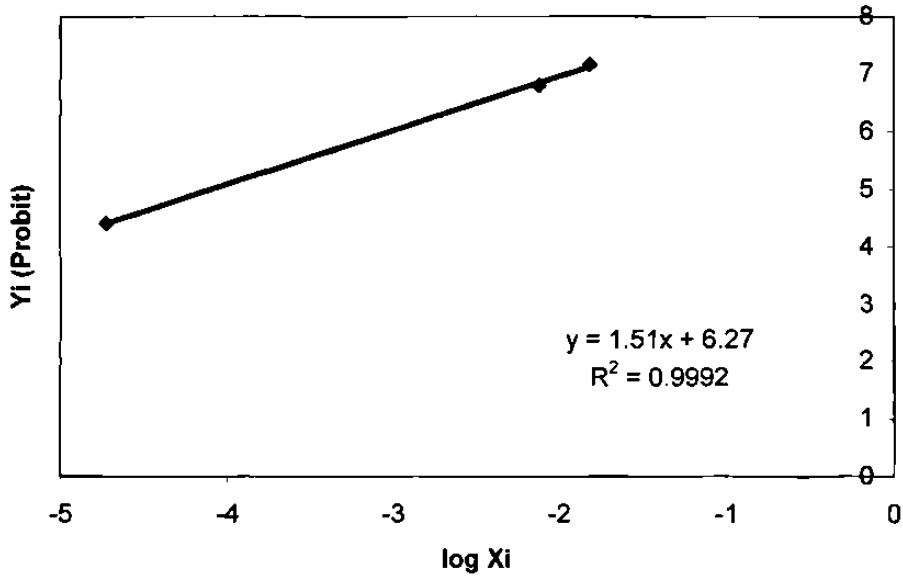


Figura 42. Diagrama de dispersión de las variables Yi probit y log Xi del bioensayo del metronidazol sobre cultivos de *E. histolytica*. En este gráfico se observa que a partir de las concentraciones evaluadas se obtuvo una $R^2 = 0.99$, valor de alta confiabilidad y de acuerdo a la ecuación obtenida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

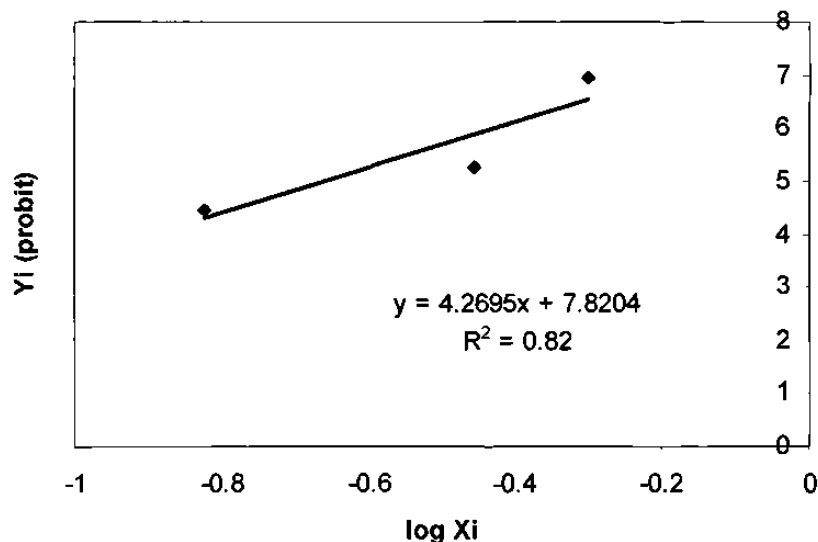


Figura 43. Diagrama de dispersión de las variables Yi probit y log Xi del bioensayo del extracto metanólico de *Castela texana* sobre cultivos de *E. histolytica*. De acuerdo a las concentraciones evaluadas del extracto metanólico de *C. texana*, se obtuvo una $R^2 = 0.82$, valor confiable y de acuerdo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

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

Tabla XI

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

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

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

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

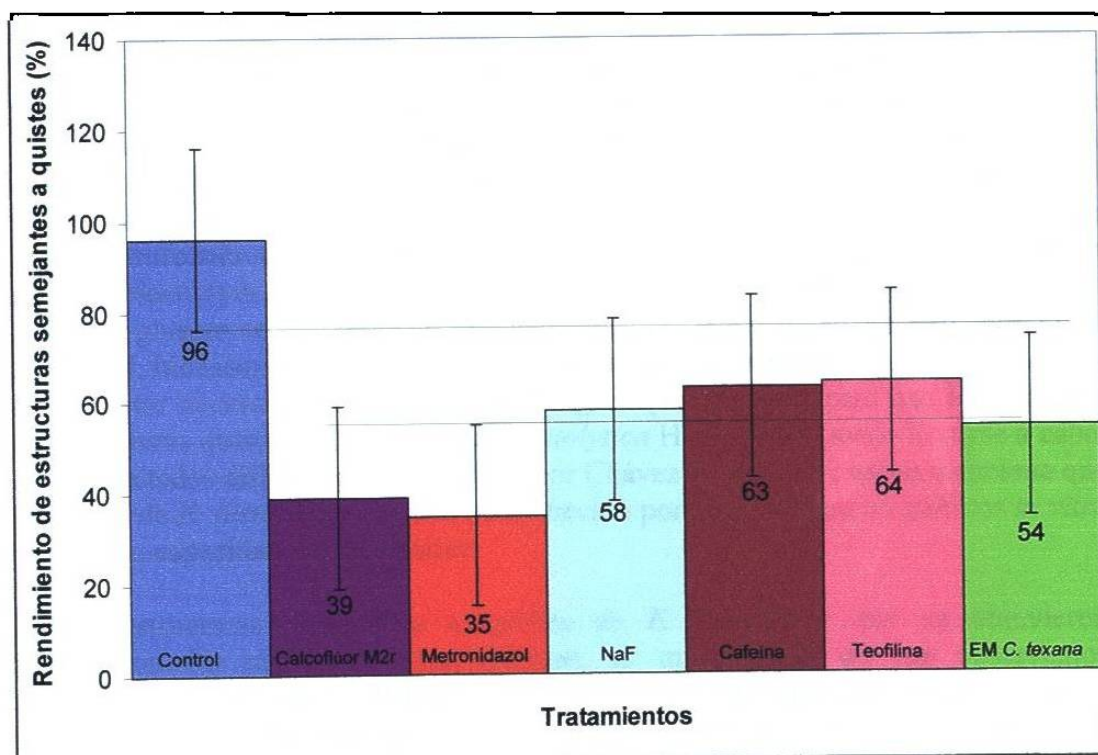


Figura 44. Evaluación de la acción de agentes químicos sobre la inducción de estructuras semejantes a quistes de *E. histolytica*. Rendimiento de estructuras semejantes a quistes (ESQ) de *E. histolytica* por acción del calcoflúor M2r (testigo negativo), metronidazol, NaF, cafeína, teofilina y extracto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

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